



INSTITUTO POLITÉCNICO DE COIMBRA
ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA

Efeito de antirretrovirais na replicação e mutagénese do Vírus da Anemia Infeciosa Equina (VAIE)

Andreia Filipa de Jesus Oliveira

Relatório de Estágio Profissionalizante para obtenção do Grau de
Mestre em Agro-Pecuária

Júri:

Presidente: Doutora, Isabel Viana de Andrade, Professora Adjunta, ESAC-IPC

Arguente: Doutora, Isaura Isabel Gonçalves Simões, Investigadora, CNC

Orientador: Doutor, Fernando José dos Santos Delgado, Professor Adjunto, ESAC-IPC

Tutor: Doutora, Isabel Maria Fidalgo dos Santos Silva Carvalho, Responsável Científica,
Equigerminal S.A

Coimbra, 2017

AGRADECIMENTOS

Para realizarmos os nossos sonhos e chegarmos à vitória precisamos enfrentar grandes obstáculos. Sem a ajuda e o apoio prestado pelas pessoas que nos são mais próximas, ou até mesmo o apoio daquelas que se cruzam na nossa vida ao longo de determinada etapa os desafios seriam bem mais difíceis de ultrapassar.

Ao meu orientador Professor Doutor Fernando Delgado, um agradecimento pelo apoio prestado neste meu percurso académico e também pelo acompanhamento que me deu ao longo deste trabalho.

Um especial agradecimento à Doutora Isabel Carvalho e ao Engenheiro Alexandre Pires, pelo carinho, atenção e colaboração dos mesmos no meu trabalho laboratorial. Pelos momentos de maior dúvida que com os seus conhecimentos contribuíram para um ótimo desenvolvimento do meu trabalho. E ainda agradecer pela oportunidade e confiança que depositaram em mim para desenvolver este projeto na Equigerminal.

Às minhas ex-colegas de trabalho, e amigas Carina Fernandes, Rute Coutinho, Sónia Pinho e Tânia Ribeiro, pela boa disposição e por todo o apoio que me prestaram ao longo destes quatro anos. Apoio este não só a nível laboratorial, mas também pelo incentivo que me deram para que eu aceitasse e concluísse com sucesso este desafio.

Um profundo agradecimento aos meus pais e irmã por todo o apoio que me deram ao longo de todo este tempo, por todas as palavras e gestos transmitidos que me fizeram acreditar de que seria capaz e levaria tudo isto até ao fim. Um obrigada muito grande também por terem tornado toda a minha formação possível.

Um agradecimento muito grande a toda a minha família, avó, madrinha, tios e primos, por todos os momentos de descontração e pelo apoio incondicional de todos eles.

Sem a ajuda de todas estas pessoas todo o meu percurso teria sido bastante mais difícil. Agradeço então a todos os que de algum modo contribuíram para que conseguisse terminar mais uma etapa da minha vida.

RESUMO

A anemia infecciosa equina (AIE) é a doença de etiologia viral provocada pelo vírus da anemia infecciosa equina (VAIE) que pertence à família *Retroviridae* do gênero *Lentivirus*. É uma doença com uma distribuição mundial, que leva a eliminação compulsiva dos cavalos infetados, uma vez que não existe cura, tratamento ou vacina disponível no mercado. Neste estudo avaliamos *in vitro* o efeito de antirretrovirais na replicação do VAIE e concluímos que o Adefovir dipivoxil (ADD) é capaz de inibir a replicação do VAIE_{WYO} com uma IC₅₀ na ordem dos 3 aos 20 nM, e uma CC₅₀ de 141.8 µM. Demonstramos também que 33 dias após infecção o ADD não perdeu a atividade antiviral, parecendo indicar uma grande estabilidade desta droga e/ou um modo de ação irreversível na inibição da transcriptase reversa do VAIE. O ADD apresentou um elevado índice de seletividade (IS) de 41,595.5. A análise da variabilidade genética da TR submetida a pressão do ADD durante vários dias demonstrou que não existem alterações significativas entre os variantes genéticos encontrados na TR do VAIE tratado com ADD e não tratado. Por tudo acima descrito concluímos que o ADD é um fármaco antiviral muito promissor para o tratamento do VAIE.

PALAVRAS-CHAVE: Retrovírus, Lentivírus, VAIE_{WYO}, Transcriptase Reversa, Antirretrovirais, Adefovir dipivoxil.

ABSTRACT

The Equine Infectious Anemia (EIA) is a disease with a viral etiology caused by the equine infectious anemia virus (EIAV) that belongs to the family Retroviridae of the genus Lentivirus. It is a disease with a worldwide distribution, which leads to the compulsory elimination of infected horses, since there is no cure, treatment or vaccine available on the market. In this study we evaluated *in vitro* the effect of antiretrovirals on VAIE replication and concluded that Adefovir dipivoxil (ADD) is able to inhibit VAIE_{WYO} replication with an IC₅₀ in the range of 3 to 20 nM and a CC₅₀ of 141.8 µM. We have also shown that ADD did not lose antiviral activity after 33 days post infection, suggesting a high stability of this drug and /or an irreversible mode of action in the inhibition of VAIE reverse transcriptase (RT). The ADD had a high selectivity index (IS) of 41,595.5. Analysis of the genetic variability of RT submitted to ADD pressure for several days showed that there were no significant changes between the genetic variants found in the RT treated with ADD and untreated. For all of the above, we conclude that ADD is a very promising antiviral drug for the treatment of VAIE.

KEYWORDS: Retrovirus, Lentivirus, EIAV_{wyo}, Reverse Transcriptase, Antiretrovirals, Adefovir dipivoxil

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	III
RESUMO	IV
ABSTRACT	V
ABREVIATURAS	XI
1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS.....	15
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
3.1. Anemia Infeciosa Equina (AIE) – Doença	16
3.2. Manifestações Clínicas	16
3.3. Transmissão da doença	17
3.4. Vírus da Anemia Infeciosa Equina (VAIE)	17
3.5. Ciclo de replicação viral	18
3.6. Medidas de controlo da AIE: diagnóstico e prevenção	19
3.7. O genoma e proteoma do VAIE	22
3.8. A TR e seus domínios	23
3.9. Antivirais e modo de ação	24
3.9.1. Análogos Nucleosídeos inibidores da TR - NITRS	26
3.9.1.1. Adefovir dipivoxil	26
3.9.1.2. Tenofovir	27
3.9.1.3. Zidovudina	28
3.10. Análogos Não-Nucleosídeos Inibidores da TR (NNITRs)	28
3.10.1. Nevirapina.....	29
3.11. Inibidores da Protéase (IPs).....	29
3.11.1. Darunavir	29
3.11.2. Indinavir	30
3.12. Outros fármacos com atividade antiviral	31
3.12.1. Daclatasvir	31
3.12.2. Ciclosporina A	31
3.13. Resistência antiviral	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1. Modelos celulares	33
4.2. Estudos in vitro de infeção com VAIE	34

4.3.	Quantificação de partículas virais de VAIE _{WYO}	34
4.4.	Ensaio antivirais in vitro com várias drogas	35
4.5.	Ensaio antivirais para determinação da CC ₅₀ e IC ₅₀	36
4.5.1.	Determinação da IC ₅₀ para o Adefovir dipivoxil (ADD)	36
4.6.	Ensaio de viabilidade celular e/ou citotoxicidade	37
4.6.1.	Determinação da CC ₅₀	38
4.6.1.1.	Determinação da CC ₅₀ do DMSO	38
4.6.1.2.	Determinação da CC ₅₀ de ADD em células ED	38
4.6.1.3.	Determinação da CC ₅₀ de ADD em células EML.....	39
4.7.	Índice de Seletividade	39
4.8.	Análise molecular do VAIE.....	39
4.8.1.	Extração do ARN viral	39
4.8.2.	Amplificação e sequenciação de variantes genéticos	39
4.8.3.	Análise do efeito do ADD na variabilidade genética da TR	40
4.8.4.	Geração de um banco genómico de VAIE	42
4.8.5.	Alinhamento e árvore filogenética de sequências de VAIE	43
4.8.6.	Mapeamento genético das sequências VAIE provenientes de diferentes origens e locais	44
5.	RESULTADOS	45
5.1.	Ensaio antivirais para o VAIE.....	45
5.1.1.	Efeito de vários antivirais na replicação do EIAV	45
5.1.2.	Efeito do Adefovir dipivoxil (ADD) na replicação de VAIE.....	46
5.1.2.1.	Determinação de IC ₅₀ do Adefovir dipivoxil	46
5.1.2.2.	Determinação da IC ₅₀ de Adefovir dipivoxil (ADD) ao longo do tempo.....	47
5.1.3.	Determinação CC ₅₀ do Adefovir dipivoxil (ADD) em células ED	49
5.1.4.	Determinação CC ₅₀ do Adefovir dipivoxil (ADD) em células Macrofágicas-EML	49
5.1.4.1.	Determinação da CC ₅₀ do DMSO em células ED	50
5.2.	Determinação do Índice de seletividade Adefovir dipivoxil	51
5.3.	Análise de variantes genéticos da TR sob pressão do Adefovir dipivoxil (ADD)	51
5.3.1.	Análise da cobertura de WYO NT	51
5.3.2.	Análise da cobertura de WYO ADD	52

5.3.3.	Variabilidade genética do VAIE _{WYO NT}	52
5.3.4.	Análise detalhada dos variantes da TR - VAIE _{WYO NT}	53
5.3.5.	Variabilidade genética VAIE _{WYO ADD}	57
5.3.6.	Análise detalhada dos variantes do gene TR - WYO ADD	57
5.3.7.	Alinhamento das sequências consenso de WYO NT com WYO ADD ...	61
5.4.	Variabilidade genética de populações de VAIE	64
5.4.1.	Alinhamento de sequências VAIE com origem geográfica diferente e diferentes isolados primários e de laboratório.....	64
5.4.2.	Mapeamento e sequência de consenso do VAIE.....	66
5.5.	Árvore Filogenética de VAIE	68
6.	DISCUSSÃO.....	71
6.1.	Ensaio Antivirais	71
6.2.	Análise de resistências genéticas de VAIE ao ADD	72
6.3.	Análise genética e filogenética do VAIE.....	75
7.	CONCLUSÃO	76
	BIBLIOGRAFIA	77
	ANEXOS	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Partícula viral de AIE.	18
Figura 2- Representação do ciclo de replicação do vírus AIE nas células hospedeiras.	19
Figura 3- Estrutura, localização e identificação das proteínas estruturais do vírus da anemia infecciosa equina (VAIE).	23
Figura 4 - Representação linear do genoma de VAIE com repetições terminais longos (LTR) e as regiões de codificação das proteínas (gag, pol, env, tat, S2 e rev).	23
Figura 5- Os 5 subdomínios estruturais da TR do VIH.	24
Figura 6- Molécula Adefovir.	27
Figura 7- Molécula Adefovir dipivoxil.	27
Figura 8- Estrutura química da molécula de Tenofovir.	28
Figura 9- Estrutura química da molécula de Zidovudina.	28
Figura 10- Estrutura química da molécula de Nevirapina.	29
Figura 11- Estrutura química da molécula de Darunavir.	30
Figura 12- Estrutura química da molécula de Indinavir.	30
Figura 13- Estrutura química da molécula de Daclatasvir.	31
Figura 14- Estrutura química da molécula de Cyclosporina A.	32
Figura 15- Diagrama esquemático dos fragmentos de PCR amplificados para sequenciação do gene da TR.	40
Figura 16- Exemplo da análise do ‘trimming’ numa sequência.	41
Figura 17- O Adefovir dipivoxil mostrou ter atividade antiviral contra o VAIE.	46
Figura 18- O efeito do Adefovir dipivoxil na replicação viral VAIE _{WYO} em células ED ao fim de 7 dias de infeção.	47
Figura 19- O efeito do Adefovir dipivoxil na replicação viral VAIE _{WYO} em células ED ao fim de 12 (painel A), 20 (painel B) e 33 (painel C) dias de infeção.	48
Figura 20- Citotoxicidade (CC ₅₀) do Adefovir dipivoxil em células ED.	49
Figura 21- Citotoxicidade (CC ₅₀) do Adefovir dipivoxil em células EML.	50
Figura 22- Avaliação da citotoxicidade do DMSO nas células ED – Determinação da CC ₅₀	50
Figura 23- Índice de seletividade do ADD. Valores de CC ₅₀ , IC ₅₀ e IS do antirretroviral ADD contra o VAIE em células ED.	51
Figura 24- Análise da cobertura das 119 sequências para WYO NT.	52
Figura 25- Análise da cobertura das 106 sequências para WYO ADD.	52

Figura 26- “Track list” do alinhamento das sequências WYO NT com a sequência de referência.	55
Figura 27- Análise dos variantes filtrados para o gene TR de WYO NT.....	56
Figura 28- “Track list” do alinhamento das sequências WYO tratatdo com Adefovir dipivoxil (WYO ADD) com a sequência de referência.....	59
Figura 29- Análise dos variantes filtrados para a região TR do WYO ADD.....	60
Figura 30- Alinhamento das sequências consensos WYO NT com WYO ADD com anotação dos conflitos observados nas duas sequências.	62
Figura 31- Conflitos existentes nas sequências consensos WYO NT e para WYO ADD.	63
Figura 32- Sequências VAIE selecionadas na base de dados pública – NCBI-Genbank.	64
Figura 33- Alinhamento das sequências de VAIE.	65
Figura 34- “Track list” da análise comparativa do alinhamento das sequências de VAIE com a sequência de referência.	67
Figura 35- Filograma radial de VAIE com distribuição geográfica diferente.....	68
Figura 36- “Cluster” ampliado com a representação das estirpes do Japão e dos USA.	69
Figura 37- “Cluster” ampliado com a representação das estirpes da Itália e da Irlanda.	70
Figura 38- Variantes genéticos comuns e não comuns entre WYO NT e WYO ADD..	74

ABREVIATURAS

%- Percentagem

°C- Graus Celsius

µl- Microlitro

AD- Adefovir

ADD- Adefovir dipivoxil

ADN- Ácido desoxirribonucleico

AIE- Anemia Infeciosa Equina

ARN - Ácido ribonucleico

bp- pares de bases

CA- Proteína da cápside

CC₅₀- Concentração Citotóxica que inibe 50% das células

CPE- Efeitos Citopáticos

DGAV- Direção Geral de Alimentação e Veterinária

DMSO- Dimetilsulfóxido

ED- Células de Derme Equina

ELISA- Ensaio imunoenzimático (“Enzyme-linked-immunosorbent assay”)

EMA- Agência Europeia de Medicamentos

EML- Células do tipo macrofágico de equinos

FDA -Administração de Alimentos e Medicamentos

gag – Gene codificante dos antígenos específicos do grupo

HTLV-1 -Vírus linfotrópico das células T humanas do tipo 1

IC₅₀- Concentração inibitória de 50%

IPs- Inibidores da Protéases

IS- Índice de Seletividade

KDa- Unidade de massa atômica

MA – Proteína da matriz

MC- Meio Completo

mL- Mililitro

mM- Milimolar

MO- Microscópio ótico

MOI- Multiplicidade de infecção (Multiplicity of infection)

MT-2 - Linhagem de célula T humana infetada pelo HTLV-1

NCBI- National Center for Biotechnology Information

NITRS- Nucleosídeos inibidores da transcriptase reversa

NNITRS- Não-Nucleosídeos Inibidores da Transcriptase Reversa

NT- Sem tratamento com antiviral

OIE- Organização Mundial de Saúde Animal “Office International des Épizooties”

p.i.- pós-infecção

PCR- Reação em cadeia da polimerase (“Polymerase chain reaction”)

pol- Gene codificante da polimerase

qPCR- Reação em cadeia da polimerase em tempo real

RT-PCR - Reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa

SNV- Variante de um único nucleotídeo

TR- Transcriptase Reversa

USDA- Departamento de Agricultura dos Estados Unidos

VAIE- Vírus Anemia Infeciosa Equina (“Equine Infectious Anemia Virus”)

VHB- Vírus da Hepatite B

VHC- Vírus da hepatite C

VHH- Herpes simples humano

VIH- Vírus da Imunodeficiência Humana (“Human immunodeficiency virus”)

1. INTRODUÇÃO

O estudo em virologia tem vindo a crescer consideravelmente, em grande parte devido à caracterização de um crescente número de doenças humanas e animais causadas por vírus. Na medicina veterinária, tal como na humana, os vírus representam um grave problema e um enorme desafio, devido ao surgimento de novos vírus e ao facto de os vírus conhecidos estarem em constante evolução, criando múltiplas resistências aos tratamentos antivirais instaurados na tentativa de os “controlar”.

As substâncias antivirais atuam em diversas fases da replicação viral, mas sempre com o principal objetivo de inibição da replicação do vírus (De Clercq, 2008).

Em medicina humana a terapia antiviral é comumente utilizada para profilaxia e/ou tratamento de doenças causadas por vírus. Mas, a utilização destas substâncias em medicina veterinária é vista ainda como uma abordagem bastante otimista (Elena e Sanjuán, 2007; Pozzo *et al.*, 2014). Até à data, em medicina veterinária não existe qualquer substância antiviral aprovada pelas entidades oficiais europeias, (a EMA - agência europeia do medicamento) e/ou norte-americanas (USDA - agência norte americana do departamento de agricultura) que tutelam a aprovação dos medicamentos veterinários. Este facto tem contribuído para a morte, eliminação e/ou eutanásia de animais vítimas de doença infectocontagiosas como única medida de controlo destas infeções.

De modo a evitar a eliminação compulsiva de animais infetados com o vírus da anemia infecciosa equina a empresa Equigerminal encontra-se a desenvolver terapias antivirais para cavalos. Enquadrando-se este estudo nesta temática

A Anemia Infecciosa Equina (AIE) é uma doença infecciosa com uma distribuição global causada por um lentivírus que é fatal para os cavalos. Os animais infetados com AIE ou morrem de doença fatal ou como consequência das políticas de controlo implementadas para esta doença. Uma vez que a AIE é de declaração compulsória e eliminação obrigatória a nível global. Por tudo acima exposto, esta é uma doença que preocupa bastante os criadores de equinos, uma vez que ainda não existe uma vacina, tratamento, ou cura para esta infeção.

À semelhança do que acontece com outros lentivírus, como por exemplo com o vírus da imunodeficiência humana – VIH, devido à sua grande variabilidade genética tem sido difícil o desenvolvimento de uma vacina eficaz para o controlo da AIE (Domingo *et al.*, 2012).

No caso do síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA), as terapias antivirais conseguiram transformar uma doença fatal dos anos 80-90 numa doença crónica tratável do século XXI.

Na Equigerminal acreditamos que as terapias antivirais podem ser uma realidade em medicina veterinária, podendo assim evitar a fatalidade da AIE, bem como a de outras doenças virais que afetam os cavalos.

2. OBJETIVOS

O presente estudo teve como principal objetivo testar o efeito de Análogos de Nucleotídeos Inibidores na replicação viral e mutagénese da Transcriptase Reversa (TR) do Vírus da Anemia Infeciosa Equina (VAIE).

Em suma, os objetivos desta tese foram:

- 1- Conhecer a eficácia de algumas drogas antirretrovirais na replicação de VAIE;
- 2- Determinar a IC₅₀ de uma droga antirretroviral mais promissora;
- 3- Determinar a CC₅₀ dessa droga antirretroviral;
- 4- Analisar a variabilidade genética do gene da TR em vírus sob pressão da droga antirretroviral;
- 5- Analisar a variabilidade genética do gene da TR e do VAIE em geral.

Para a concretização destes objetivos foram realizadas variadas e diferentes tarefas, tais como:

- Estudos de replicação do VAIE em cultura de células dérmicas equinas (ED) na presença ou ausência de diferentes drogas antirretrovirais.
- Avaliação da cinética de replicação viral através de métodos moleculares de “Reverse transcriptase qPCR” (RT qPCR) para quantificação de partículas virais.
- Estudos *in vitro* de citotoxicidade celular de modo a determinar a concentração citotóxica que inibe 50% da viabilidade celular (CC₅₀) utilizando testes quantificáveis de viabilidade celular, o ensaio do PrestoBlue™ do tipo fluorimétrico.
- Estudos *in vitro* de eficácia de drogas antirretrovirais de modo a determinar a concentração de inibição de 50% (IC₅₀) da replicação do VAIE.
- Estudos de amplificação específica seguidos de sequenciação do gene da TR para obtenção de sequências genéticas de vírus tratados, ou não tratados com antirretroviral.
- Análise genética da TR em populações virais (quasispecies) tratadas ou não tratadas com droga antirretroviral de modo a avaliar o potencial desenvolvimento de resistências ao antirretroviral.
- Estudos de análise genética comparativa das diferentes estirpes de VAIE provenientes de isolados geograficamente distantes.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Anemia Infeciosa Equina (AIE) – Doença

A Anemia Infeciosa Equina (AIE) ou febre dos pântanos é uma doença viral e potencialmente fatal que atinge todos os membros da família dos Equídeos. Todas as raças e idades são suscetíveis à doença, porém animais subnutridos, parasitados e debilitados têm maior predisposição. A AIE representa um grande desafio e causa perdas significativas no sector equino em todo o mundo (Maresca *et al.*, 2012).

A AIE é uma das 11 doenças específicas de equinos que se encontram listadas pela Organização Mundial de Saúde Animal. Esta organização é conhecida pela sigla OIE, sendo uma organização intergovernamental, com sede em Paris, cujo acrónimo deriva da antiga designação em francês “Office International des Epizooties” e que em 2003 mudou a sua designação para “World Organisation for Animal Health”. A OIE recomenda que a AIE seja de declaração compulsória e eliminação obrigatória. Estas recomendações são seguidas por quase todos os países e regiões. Uma vez que não existe vacina, tratamento ou cura para esta doença, é de extrema importância a notificação de animais infetados à OIE. Pois animais infetados podem ser portadores assintomáticos e potentes disseminadores da doença (Cook *et al.*, 2013).

3.2. Manifestações Clínicas

O primeiro caso clínico de AIE foi descrito pela primeira vez na Europa, em França em 1843 (Harrold *et al.*, 2000; Lignée, 1843), como ‘La Maladie du sang du cheval’. A doença foi caracterizada por episódios periódicos de febre, anemia hemolítica, icterícia, depressão, edema e perda de peso crónica. A etiologia viral foi determinada em 1904, por Carré e os seus colaboradores (Vallée e Carré, 1904; Cook *et al.*, 2013).

A doença pode ser manifestada em diferentes fases: aguda, crónica e inaparente. A severidade dos sinais clínicos varia de acordo com a estirpe viral, quantidade de vírus transmitido e o sistema imunológico do hospedeiro (Cheevers e McGuire, 1985). As manifestações clínicas da AIE podem apresentar episódios febris, (ou seja, temperaturas rectais acima 39°C), anorexia, fraqueza, edema do abdómen inferior e membros, pulso fraco, batimentos cardíacos irregulares, diarreia, fezes manchadas de sangue, anemia e trombocitopénia. A fase aguda ocorre 1 a 2 meses após infeção caracterizando-se por episódios febris frequentes (Cruz *et al.*, 2015; Leroux *et al.*, 2001). A fase crónica é caracterizada por ciclos recorrentes de febre, virémia, anemia e anorexia, podendo também

ocorrer sinais clínicos neurológicos (Oaks *et al.*, 2004). Ao longo do tempo os picos de febre vão se tornando mais espaçados e os animais entram numa fase inaparente, em que os sinais clínicos desaparecem, no entanto é ainda possível a deteção de vírus em circulação (Cullinane *et al.*, 2007). Os animais inaparentes são importantes reservatórios de AIE e quando submetidos a stress e a imunossupressão podem reverter a doença à sua fase crónica (Cook *et al.*, 2002; Issel *et al.*, 2014).

A AIE tem uma distribuição mundial. A OIE tem vindo a relatar casos clínicos de AIE em todos os continentes, incluindo o Europeu. Mais recentemente foi confirmado um foco de VAIE em Espanha, a 18 julho do presente ano, tendo sido assinalada esta informação pela Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV). De acordo com os registos da OIE em Portugal foi relatado um único caso de AIE em 1985, considerando-se à data um país indemne desta doença (OIE, 2017).

3.3. Transmissão da doença

O Vírus da Anemia Infeciosa Equina (VAIE) foi o primeiro retrovírus citado como sendo transmitido por insetos (Hawkins *et al.*, 1973). A sua transmissão é efetuada via sanguínea podendo ocorrer pela picada de insetos da família *Tabanidae* – tais como as moscas dos cavalos (*Tabanus spp.* e *Hybomitra spp.*) e moscas dos veados (*Chrysops spp.*) - e *Muscidae* - mosca dos estábulos (*Stomoxys calcitrans*); através fomites ou por via iatrogénica. A mais importante via de transmissão do VAIE ocorre, pela ação do homem, através da reutilização de agulhas, seringas, luvas e pela partilha de selas que tiveram contato com sangue de um animal infetado (Cook *et al.*, 2013; Issel *et al.*, 2014).

3.4. Vírus da Anemia Infeciosa Equina (VAIE)

A AIE é causada por um vírus da família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae* e género *Lentivirus* (Charman *et al.*, 1976; Issel *et al.*, 2014). Ao género dos *Lentivirus* pertence também o vírus da imunodeficiência humana (VIH), o vírus da imunodeficiência símia (VIS), o imunodeficiência felina (VIF), o vírus Maedi-visna dos caprinos (MVV), o vírus da imunodeficiência bovina (BIV), entre outros, (Cullinane *et al.*, 2007; Olmsted *et al.*, 1992; Ryan *et al.*, 2000).

Durante anos o conhecimento da biologia molecular do VAIE foi atrasado devido à falta de um sistema de propagação viral em cultura celular. O desenvolvimento de modelos *in vitro* (Malmquist e Barnett, 1973) para a produção de partículas virais

possibilitaram a classificação do VAIE, e desta forma permitiram iniciar estudos bioquímicos e moleculares (Leroux *et al.*, 2004).

Os retrovírus foram descritos pela primeira vez na década dos anos 70, quando se descobriu que o vírus de ARN contém uma cadeia simples de ARN associada à enzima TR. A enzima TR é uma enzima que produz ADN tendo como modelo o ARN viral. Esta enzima faz a transcrição reversa, contrariamente ao que normalmente acontece nas células, onde o ARN é produzido a partir de um ADN que lhe serve de modelo. À medida que sintetiza o ADN, a TR degrada o ARN modelo. Em seguida, a enzima produz uma cadeia de ADN complementar à que foi copiada de ARN viral, originando uma molécula de ADN de cadeia dupla. O ADN será utilizado para transcrever moléculas de ARN que atuam como mensageiras na síntese das proteínas virais. O ADN produzido pela TR é também utilizado na síntese do ARN que constituirá o genoma dos novos vírus formados na célula infetada (Coffin *et al.*, 1997).

A microscopia eletrónica permitiu observar a organização ultraestrutural do VAIE, sendo este constituído por uma mistura de partículas ovais ou circulares com aproximadamente 115 nm de diâmetro, um ‘core’ de formato cónico – o capsídeo - encapsulado numa matriz proteica e delimitado por uma membrana lipídica contendo numerosas projeções de 6-8nm (Matheka *et al.*, 1976; Weiland *et al.*, 1977) (

Figura 1).



Figura 1- Partícula viral de AIE. Fonte: (Weiland *et al.*, 1977, p.338)

3.5. Ciclo de replicação viral

Os lentivírus dispõem de características físicas e genómicas comuns assim como um ciclo de replicação comum, apesar da ampla diversidade genética que existe entre os vírus da família Retrovírus. O ciclo de replicação é caracterizado por um processo de vários passos que ocorre em várias fases definidas (Figura 2):

- a) a primeira fase é a entrada onde ocorre a ligação às células, com fusão e penetração do vírus dentro destas;
- b) na segunda fase ocorre a propagação que inclui a transcrição reversa, integração, transcrição, produção de proteína e montagem das partículas de vírus;
- c) a terceira fase ocorre com o ‘budding’ e ‘packaging’ das proteínas virais na membrana celular que culmina com o egresso ou saída das partículas virais utilizando as membranas celulares;
- d) a quarta fase que contempla a maturação dos vírus com a reorganização da arquitetura do vírus de modo a se transformarem em vírus infectivos capazes de infectar novas células (Figura 2) (Leroux *et al.*, 2004).

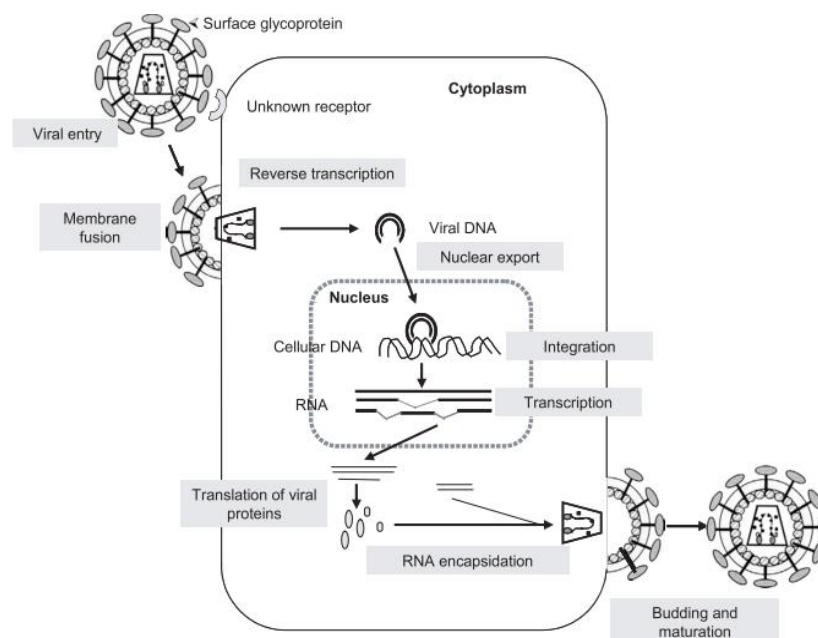


Figura 2- Representação do ciclo de replicação do vírus AIE nas células hospedeiras.
Fonte: (Leroux et al. 2004, p.489)

3.6. Medidas de controlo da AIE: diagnóstico e prevenção

Os meios de controlo da AIE baseiam-se na identificação do animal e diagnóstico serológico. Os métodos de diagnóstico recomendados pela OIE são o teste de IDGA (ensaio de imunodiagnóstico pela técnica de Imunodifusão em Gel de Agar), a ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática) ou o *immunoblotting*.

De acordo com as recomendações da OIE e a lei Europeia os animais determinados como seropositivos devem ser eliminados de modo a evitar a disseminação desta doença incurável. Todos os países da União Europeia interpretaram esta eliminação

de seropositivos como a destruição dos seropositivos, com a exceção da Itália onde é introduzida a possibilidade destes seropositivos serem colocados em quarentena ou isolamento. Estas medidas de quarentena de seropositivos são também aprovadas no Pantanal, uma região do Brasil e alguns estados dos Estados Unidos da América (EUA) (Cappelli *et al.*, 2011; Issel *et al.*, 2014).

Os métodos de imunodiagnóstico ou serológicos permitem a detecção de anticorpos anti-VAIE, utilizando todo o vírus como um antigénio ou apenas determinadas proteínas virais recombinantes, em amostras de soro de cavalos infetados com VAIE. O teste IDGA permite a detecção de precipitados entre a proteína p26, proteína do capsídeo do VAIE e os anticorpos presentes em soros e/ou plasmas de equinos. Em muitos países o IDGA é o único teste oficialmente reconhecido, para o diagnóstico de VAIE (Dong *et al.*, 2012).

Atualmente, são comercializados e aprovados pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) quatro kits de ELISA de diagnóstico de VAIE. Um kit ELISA de competição que permite a detecção de anticorpos anti-p26, três kits de ELISA não-competição, em que dois utilizam a p26 como antigénio e o terceiro utiliza simultaneamente a p26 e a glicoproteína gp45 para a detecção de AIE em soros de equinos. Quando comparado com o teste de IDGA, o teste ELISA é mais vantajoso uma vez que é um teste mais rápido e de menor subjetividade na leitura de resultados. A análise do teste IDGA tem um tempo de incubação de 24 - 48 horas, de leitura qualitativa, baseando-se na observação a olho nu de linhas de precipitação. Enquanto o teste de ELISA tem uma duração de 3 horas, é baseado numa análise quantitativa dos valores de absorvância adquiridos num espectrofotómetro. Sendo o IDGA um teste de confirmação padrão da OIE para a AIE, todas as amostras positivas ou duvidosas por ELISA deveram ser testadas pelo teste de IDGA (Issel e Cook, 1993; OIE, 2013).

Hoje em dia, existem outros métodos de diagnóstico com maior sensibilidade e especificidade para a detecção do vírus AIE. O imunoblotting (Western Blot) é um dos métodos sorológicos mais sensíveis, pois deteta, simultaneamente, a reação de anticorpos anti- gp90, anti-gp45 e anti-p26 com as respetivas proteínas virais. Este método não está disponível comercialmente, no entanto, tem sido utilizado como método de auxílio de diagnóstico da AIE no laboratório referência da Universidade de Kentucky, nos Estados Unidos (Issel *et al.*, 1999; Issel *et al.*, 2014).

Os métodos moleculares de diagnóstico, tais como reações de polimerização em cadeia (PCR), reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)- detecção de ADN proviral - e reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa (RT qPCR) - detecção

de genoma ARN - permitem detetar o próprio genoma do VAIE. Para desenvolvimento de um teste molecular eficaz para o diagnóstico de VAIE é necessária a identificação de regiões altamente conservadas do genoma do VAIE (Dong *et al.*, 2012).

Os métodos moleculares de diagnóstico enfrentam obstáculos devido à grande variabilidade genética dos isolados primários, a instabilidade do ARN viral e a presença de um baixo número de partículas virais (10^2 - 10^4 partículas virais/mL de sangue) em circulação em animais na fase inaparente de infecção. A grande variabilidade genética do VAIE deve-se à sua distribuição geográfica, e à constante evolução do genoma viral ao longo do tempo. Juntamente com a ausência de estudos genéticos acerca de isolados primários, provenientes de locais geograficamente distantes têm dificultado a implementação de um teste molecular de diagnóstico para o VAIE. Deste modo, até à data não existe um teste diagnóstico molecular capaz de detetar todos os isolados primários de VAIE (Cullinane *et al.*, 2007; Issel e Cook, 1993; Jin *et al.*, 1999; Scicluna *et al.*, 2013).

Atualmente, a forma mais eficaz para controlar as doenças infecciosas é a vacinação (Howe *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2016). O desenvolvimento de uma vacina segura e efetiva para os lentivírus continua a ser um enorme desafio científico devido à grande variabilidade genética destes vírus. No caso do VAIE, a escassa informação genética acerca de isolados primários representa ainda um obstáculo adicional (Cook *et al.*, 2013; Craig *et al.*, 2015; Domingo *et al.*, 2012).

A AIE é uma doença endémica, descrita há mais de 150 anos, afetando populações de equinos por todo o mundo. Embora a AIE tenha uma distribuição mundial as sequências genómicas de ARN completas só foram obtidas de dois isolados de VAIE_{WYO} (NCBI referencia sequência: NC_001450, isolado Estados Unidos) e o VAIE_{Liaoning} (GenBank referencia sequência AF327877, isolado da China). O VAIE_{WYO} representa o primeiro clone viral completo e foi obtido a partir da adaptação da estirpe Wyoming em linhas celulares de fibroblastos da derme de equinos (células ED) (Whetter *et al.*, 1990; Malmquist e Barnett, 1973). A maioria das sequências disponíveis no Genbank resultaram de adaptações em laboratório das estirpes acima descritas. As estirpes virais podem ser caracterizadas quanto à sua virulência e à sua capacidade de crescer em culturas celulares (Capomaccio *et al.*, 2012; Craig *et al.*, 2009; Dong *et al.*, 2013). Capomaccio e colaboradores realizaram a análise filogenética das sequências VAIE onde observaram uma forte associação destas estirpes à sua distribuição geográfica (Capomaccio *et al.*, 2012). No total, contando com ARN e ADN proviral, foram

publicadas sequências genómicas de 5 diferentes regiões ou países: o VAIE_{WYO} dos Estados Unidos, o VAIE_{LIA} da China, o VAIE_{IRE} da Irlanda, o VAIE_{MIY} do Japão e o VAIE_{ITA} da Itália. A estas estirpes estão associadas outras, ‘quasispecies’ (Cappelli *et al.*, 2017). Estas estirpes virais apresentam cerca de 80% ou mais de uma variedade de espécies genómicas designadas por quasispecies. Muitos investigadores desenvolveram clones do VAIE, com o intuito de se obter populações genómicas mais homogêneas, permitindo assim, estudos em virologia, patogénese, clonagem molecular e replicação viral (Cook *et al.*, 1998; Issel *et al.*, 2014; Payne *et al.*, 1994; Quinlivan *et al.*, 2013).

3.7. O genoma e proteoma do VAIE

O VAIE possui aproximadamente 8,2 kb, quando comparado a outros lentivírus conhecidos, este é o que apresenta uma organização genómica mais simples (Issel *et al.*, 2014) (Figura 3). Tal como os outros retrovírus, o VAIE possui três genes principais (*gag*, *pol* e *env*), flanqueados por repetições terminais longas (LTR) contendo sequências reguladoras (Cook *et al.*, 2013). O gene *gag* e *env* codificam para as proteínas estruturais ao passo que o gene *pol* codifica para as proteínas funcionais. O gene *gag* codifica a poliproteína precursora - o Gag - que depois de clivada pela protease viral dá origem às proteínas do core – a capsídeo ou p26, a matriz ou p15, a nucleocápsídeo ou p11 e a proteína p9 que contem o domínio L, o facilitador do egresso do vírus. O gene *pol* codifica para as enzimas protease (PR), TR (RT), DUTPase e integrase (IN), que são cruciais na maturação viral (PR), transcrição reversa (RT e DUTPase) do ARN viral em ADN linear de cadeia dupla e na integração do genoma nas células do hospedeiro (IN). O gene *env* codifica para as duas glicoproteínas do envelope, a unidade de superfície (SU) ou gp90 e a gp45. Por sua vez a gp45 é composta por uma unidade transmembranar (TM) e a cauda intracitoplasmática (CT). Estas duas glicoproteínas, gp90 e gp45, estão envolvidas na ligação ao recetor celular e infeção subsequente de célula hospedeira. (Issel *et al.*, 2014).

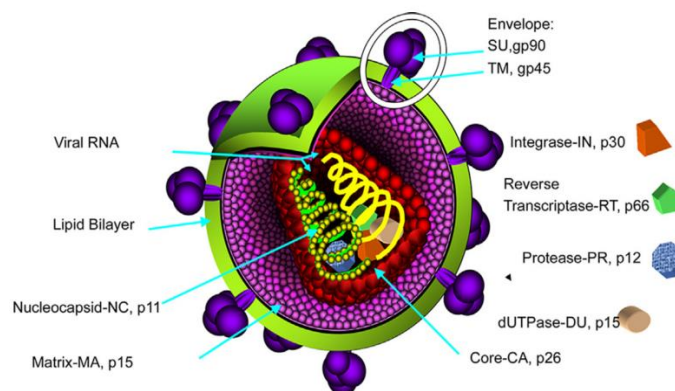


Figura 3- Estrutura, localização e identificação das proteínas estruturais do vírus da anemia infecciosa equina (VAIE). Fonte: (Issel *et al.*, 2014, p.563)

Além destes genes e proteínas estruturais e funcionais, essenciais ao ciclo viral, existem outros genes e proteínas acessórias, ou seja, não essenciais à replicação viral. Contrastando com as seis proteínas acessórias, codificadas pelo genoma do VIH, o VAIE possui apenas três proteínas acessórias, duas das quais são comuns a todos os lentivírus – a *Tat* e *Rev* – e uma proteína exclusiva do VAIE denominada de proteína S2. As proteínas *Tat* e *Rev* estão envolvidas na replicação viral. A proteína reguladora *Tat* atua como o transativador da replicação. A proteína *Rev* atua no transporte do ARN viral para o núcleo a partir do citoplasma. A proteína acessória, S2 parece ter um papel essencial na virulência do VAIE, embora o seu mecanismo de ação ainda não seja totalmente conhecido (Figura 4) (Issel *et al.*, 2014).

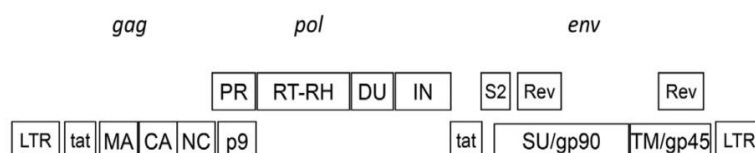


Figura 4 - Representação linear do genoma de VAIE com repetições terminais longos (LTR) e as regiões de codificação das proteínas (*gag*, *pol*, *env*, *tat*, *S2* e *rev*). Fonte: (Issel *et al.*, 2014, p.563).

3.8. A TR e seus domínios

As TRs retrovirais, tais como as do VHI-1 e VIH-2 e VAIE, mostram uma organização e estrutura muito semelhante entre si. A região que codifica para o domínio central, a ADN- polimerase, é a região mais conservada do genoma do ponto de vista filogenético. A TR é uma enzima multifuncional que possui atividade de ADN-polimerase dependente de ARN e ADN e atividade de ribonuclease H (ARNase H). A TR

do VIH encontra-se muito bem estudada e serve como modelo para as TR de outros lentivírus. Esta proteína na sua forma ativa apresenta-se com um heterodímero de duas subunidades, a p66 que intervém na incorporação de nucleotídeos e a p51 que mantém a conformação apropriada da enzima durante transcrição reversa (Souquet *et al.*, 1998; Agopian *et al.*, 2009; Issel *et al.*, 2014). A p66 encontra-se dividida em cinco subdomínios, quatro subdomínios da ADN polimerase e um domínio RNase H. Os cinco subdomínios estruturais da TR do VIH são: “dedos” (fingers), “palma” (palm), o “polegar” (thumb), a “conexão” (connect) e por fim ARNase H (Figura 5). Estes subdomínios estruturais da TR estão associados a 4 domínios funcionais: 1) RVT_Like ou RVT-1 equivalentes ao ‘*fingers*’ e ‘*palms*’; 2) o RVT_thumb equivalente ao “thumb”; 3) o RVT_connect ao “connect”; e 4) e a ARNase_H (Figura 5). A ARNase H é uma endonuclease que cliva a cadeia de ARN de um híbrido de ARN/ADN de uma forma não específica e na presença de catiões divalentes (Goff, 1990; Kohlstaedt *et al.*, 1992; Coffin *et al.*, 1997).

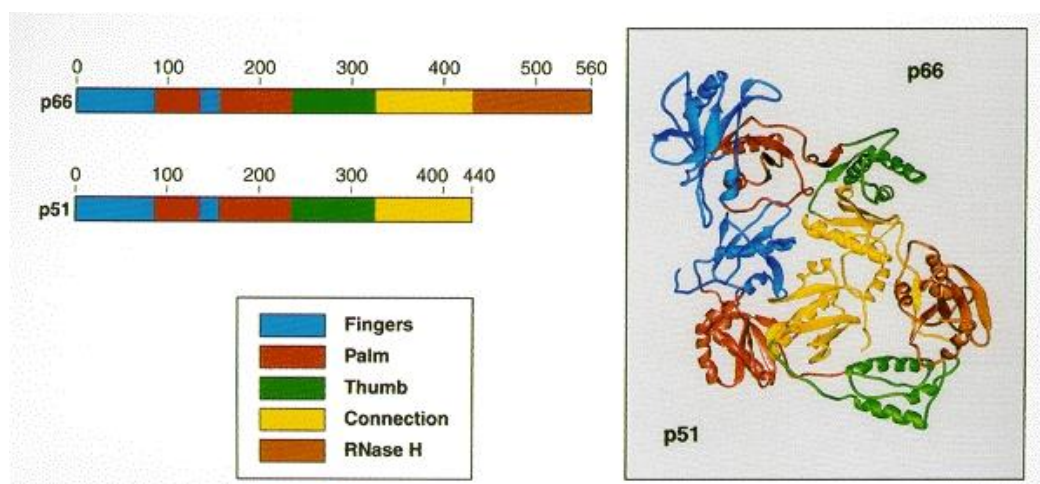


Figura 5- Os 5 subdomínios estruturais da TR do VIH. Fonte: (Coffin *et al.*, 1997)

3.9. Antivirais e modo de ação

As terapias antivirais representam um marco na indústria farmacêutica e em medicina. Nos últimos 50 anos constituíram uma área prioritária na investigação, desenvolvimento e inovação (IDI) demonstrando grandes crescimentos tanto no meio académico como na indústria farmacêutica. Este crescimento foi propulsionado pelo aparecimento do VIH nos anos 80 e mais recentemente pelas hepatites virais humanas. Devido a estas terapias, doenças fatais como a SIDA, bem como a hepatite viral do tipo

B (HVB) e hepatite viral do tipo C (HVC) foram transformadas em doenças crônicas controláveis.

O desenvolvimento destes fármacos até à sua entrada no mercado são processos demorados e bastantes dispendiosos de forma a garantir a sua segurança e eficácia no tratamento das doenças a que se destinam.

Os fármacos antivirais são substâncias com capacidade de bloquear uma das etapas da replicação viral sem interferir demasiado na biologia normal da célula hospedeira. Um exemplo de um antiviral é aquele que é capaz de prevenir a replicação do vírus e/ou possa inibir a atividade da protease viral e/ou consiga impedir a transcrição reversa de ácidos nucleicos retrovirais e/ou possa evitar o início ou a progressão de uma infeção viral num animal, ou hospedeiro. Um antiviral ideal deve apresentar algumas características, tais como: penetrar na célula, possuir um largo espectro, ter especificidade para as enzimas virais ou induzidas pelos vírus, possuir potência suficiente para inibir completamente a replicação viral, não conduzir ao desenvolvimento de resistências, exibir uma toxicidade mínima para a célula hospedeira, não interferir com os mecanismos normais de defesa celular e por último não suprimir o processo normal de desenvolvimento da imunidade ativa do hospedeiro (Pozzo *et al.*, 2014).

Os medicamentos ou fármacos antirretrovirais são qualificados de acordo com a fase de atuação no ciclo de replicação viral. Por exemplo os que bloqueiam a atividade enzimática da TR impedindo a síntese de ADN viral são apelidados de fármacos inibidores da TR. Nestes últimos anos, os análogos de nucleosídeos e nucleotídeos acíclicos fascinaram os cientistas mostrando-se de grande interesse no tratamento de doenças causadas por vírus como o VIH, o Vírus da Hepatite B (VHB), o herpes vírus (HV), entre outros, podendo ser utilizados como medicamentos antivirais (Tang *et al.*, 2007). Os fármacos análogos de nucleosídeos inibidores da TR os NITRs, atuam na fase de propagação viral e incluem fármacos como por exemplo o Adefovir, a Zidovudina, o Tenofovir, o Abacavir, a Lamivudina, a Estavudina, a Emtricitabina, a Zalcitabina, e a Didanosina e atuam através da sua incorporação no ADN viral levando ao término da cadeia. Ao passo que os análogos não-nucleosídeos inibidores da transcriptase reversa, os NNITRs, tais como a Nevirapina, o Efavirenz e a Delavirdina bloqueiam o potencial de ligação da TR aos ácidos nucleicos do vírus.

Os Inibidores da Protease, o IPs, atuam na fase de maturação viral e incluem o Ritonavir, o Indinavir, o Darunavir, o Saquinavir, o Lopinavir, o Amprenavir, entre outros. Estes fármacos impedem a reorganização e maturação das partículas virais ao

bloquear a protease viral, uma enzima essencial à clivagem das poliproteínas virais gag e gag-pol necessárias à maturação e transformação das novas partículas virais em viriões infechos.

Os inibidores de fusão, como é exemplo o Enfuvirtide, bloqueiam a fusão do vírus com a membrana celular ao ligar-se ao envelope (gp41) do VIH-1 e subsequente impede a entrada nas células do hospedeiro. Os inibidores de entrada, como o Maraviroc, ligam-se aos recetores celulares CCR5, que se encontram à superfície da membrana celular, impedindo a entrada do VIH na célula hospedeira (Naesens *et al.*, 1997; Asahchop *et al.*, 2012; Bean, 2005; Famiglini e Silvestri, 2016).

3.9.1. Análogos Nucleosídeos inibidores da TR - NITRS

Os NITRS foram as primeiras drogas utilizadas no tratamento do VIH. Estas drogas sofrem fosforilação por parte de cinases celulares transformando-se na forma farmacologicamente ativa dos NITRs, o anabolito trifosfato intracelular, o NITR-TP. Após a fosforilação pelas enzimas intracelulares estes fármacos competem com os nucleosídeos naturais ligando-se ao sitio ativo da TR e depois incorporados pela própria TR no novo ADN viral. O NITR incorporado inibe o alongamento da nova cadeia de ADN bloqueando assim o processo de propagação viral (Bean, 2005; Enomoto *et al.*, 2011). Neste estudo foram testados os seguintes NITRs:

3.9.1.1. Adefovir dipivoxil

O Adefovir (9- (2-fosfometoxoetil) adenina) (Figura 6) é atualmente utilizado como medicamento prescrito para o tratamento de infeções pelo VHB e infeções por vírus herpes simples humano (VHH). O Adefovir é também conhecido como PMEa e pode ser também encontrado sob a sua forma de pró-droga, o Adefovir dipivoxil, designado por bis-POM PMEa. O Adefovir foi considerado eficaz no tratamento do VIH, no entanto mostrou ser demasiado nefrotóxico quando usado a longo prazo, sendo um tratamento fracassado para o VIH (Naesens *et al.*, 1997; Hadziyannis *et al.*, 2003; Sciences, 2011). O Adefovir foi desenvolvido pela primeira vez no Instituto de Química Orgânica e Bioquímica, Academia de Ciências da República Checa por Antonín Santo. O fármaco Adefovil dipivoxil foi mais tarde desenvolvido com a marca Preveon pela Gilead Sciences para o tratamento de VIH (Garré *et al.*, 2007). Depois de demonstrado como um fracasso no tratamento do VIH o Adefovir dipivoxil é agora vendido para o tratamento

de infecções de hepatite viral B humana (VHB) sob a marca Hepsera (De Clercq, 2008; Mulato e Cherrington, 1997).

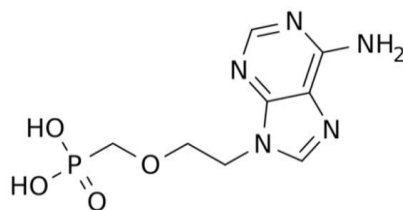


Figura 6- Molécula Adefovir (adaptada de Pubchem, 15 agosto 2017).

A forma pró-droga de Adefovir, o Adefovir dipivoxil contém duas unidades de pivaloiloximetilo. O nome químico do Adefovir dipivoxil é 9- [2 - [bis [(pivaloiloxi) - metoxi] -fosfinil] -metoxi] etil] adenina. Com a fórmula molecular de $C_{20}H_{32}N_5O_8P$, um peso molecular de $501,48 \text{ g mol}^{-1}$, e uma fórmula estrutural como se segue (Figura 7):

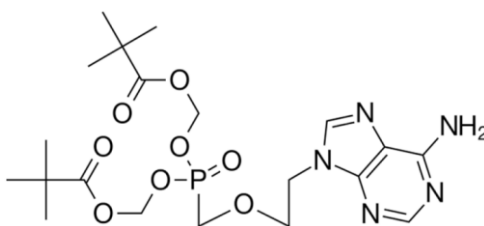


Figura 7- Molécula Adefovir dipivoxil (adaptada de Selleckchem, acedido a 15 agosto 2017).

3.9.1.2. Tenofovir

O Tenofovir é um antiviral, incluindo a sua forma pró-droga Tenofovir disoproxil fumarato, sendo comercializado pela Gilead Sciences sob o nome comercial Viread, para o tratamento da hepatite viral do tipo B crónica e VIH (aprovado pela FDA), este último combinado com outros antivirais (Michailidis *et al.*, 2009; Boyer *et al.*, 2012). Tal como o Adefovir, este NITR foi também inicialmente sintetizado por Antonín Santo. O nome químico do antiviral Tenofovir é representada pela IUPAC como [(2R) -1- (6-aminopurina-9-il) propano-2-il] ácido oximetilfosfónico, tendo como fórmula química $C_9H_{14}N_5O_4P$ e com peso molecular de $287. \text{ g mol}^{-1}$, com a estrutura química representada na Figura 8 (Hol e Rosenberg, 1989):

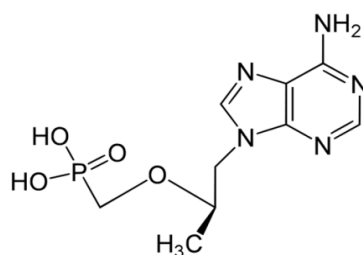


Figura 8- Estrutura química da molécula de Tenofovir (adaptada de Hol e Rosenberg, 1989).

3.9.1.3. Zidovudina

O antiviral Zidovudina é um NITR utilizado no tratamento do VIH e atua como bloqueador da cadeia de ADN na reação da TR, após fosforilação intracelular em AZT 5'-trifosfato e, após a remoção do grupo difosfato, na incorporação de AZT 5'-mofosfato na extremidade 3' da cadeia de ADN viral. Apresenta-se com a fórmula química $C_{10}H_{13}N_5O_4$ e com peso molecular de $267.24 \text{ g mol}^{-1}$ e apresenta a estrutura química que se segue na Figura 9 (Borroto-Esoda e Boone, 1991; De Clercq, 2004):

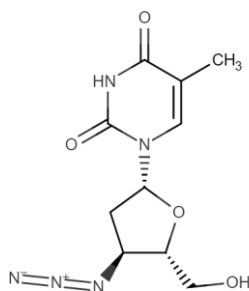


Figura 9- Estrutura química da molécula de Zidovudina (adaptada de Selleckchem, acedido a 15 agosto 2017).

3.10. Análogos Não-Nucleosídeos Inibidores da TR (NNITRs)

Ambos, os NITRs e NNITRs, são antivirais que têm como alvo a TR, porém o seu mecanismo de ação é diferente. Os NITRs competem pela sua incorporação no genoma do vírus, enquanto os NNITRs bloqueiam o alongamento de ADN complementar ligando-se diretamente e não competitivamente à enzima. Estes não necessitam de fosforilação intracelular para se tornarem ativos e inibirem a replicação viral. Os NNITRs são muito benéficos no tratamento antiviral, pois a sua potência e tolerabilidade faz com que estes não apresentem toxicidade nem resistência cruzada viral comparativamente aos NITRs

(De Clercq, 2010; Das *et al.*, 2012). O antiviral a seguir apresentado, foi o único NNITRs testado neste ensaio.

3.10.1. Nevirapina

Nevirapina é um fármaco NNITR aprovado em 1996 para o tratamento de indivíduos infectados com VIH (Famiglini e Silvestri, 2016). Conhecido por Viramune® e com a seguinte estrutura química (Figura): 11-cyclopropyl-5,11-dihydro-4- methyl-6H-dipyrido[3,2-b:2',3'-f][1,4]diazepin-6-one. É representado com a fórmula química $C_{15}H_{14}N_4O$ e com peso molecular de 266.3 g mol^{-1} e apresenta a estrutura química:

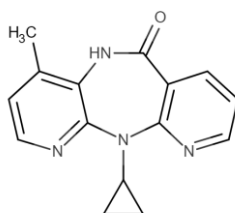


Figura 10- Estrutura química da molécula de Nevirapina (adaptada de Das *et al.*, 2012).

O seu mecanismo de ação é semelhante aos outros NNITRs ligando-se diretamente à TR e bloqueando a atividade de polimerase provocando uma clivagem do centro catalítico da enzima (De Clercq, 2004).

3.11. Inibidores da Protéase (IPs)

As protéases do VIH possuem uma função essencial no ciclo de vida do VIH pela clivagem das poliproteína precursoras gag e gag-pol que produzem proteínas e enzimas essenciais à obtenção de viriões maduros. As IPs do VIH possuem mecanismos diferentes dos NITRs, na medida em que a inibição da protéase do VIH afeta diretamente as células infectadas ao impedir a produção de partículas virais infecciosas (Bean, 2005). Os dois compostos da classe dos IPs, darunavir, indinavir, foram testados no presente estudo.

3.11.1. Darunavir

Darunavir é um inibidor da protéase do VIH. Este evita a replicação do VIH por ligação ao centro ativo da enzima, evitando assim a dimerização e a atividade catalítica da protéase do VIH. O Darunavir é comercializado com o nome Prezista™ para o tratamento de VIH, possui uma elevada barreira genética ao desenvolvimento de resistências e é ativo contra várias estirpes de VIH. O Darunavir exhibe-se na fórmula

química $C_{27}H_{37}N_3O_7S.C_2H_5OH$ com massa molecular de 593 g mol^{-1} e apresenta a estrutura química, podendo se observar a sua estrutura química na figura seguinte (Figura): (Deeks, 2014; Menéndez-Arias, 2013; Ramsay *et al.*, 2014)

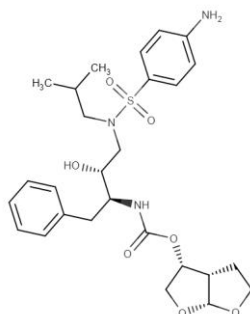


Figura 11- Estrutura química da molécula de Darunavir (adaptada de Menéndez-Arias, 2013).

3.11.2. Indinavir

O Indinavir é outro IP, com capacidade de inibir a protease do VIH, prevenir a clivagem da poliproteína Gag-Pol, resultando em partículas virais imaturas não infecciosas. O Indinavir é quimicamente conhecido (1(1S,2R),5(S))-2,3,5-Trideoxy-N-(2,3-dihydro-2-hydroxy-1H-inden-1-yl)-5-(2-(((1,1-dimethylethyl)amino)carbonyl)-4-(3-pyridinylmethyl)-1-piperazinyl)-2-(phenylmethyl)-D-erythro-pentonamide), em que a sua formula química é $C_{36}H_{47}N_5O_4$ com uma massa molecular de $613.7895 \text{ g mol}^{-1}$. A sua estrutura química está representada na Figura (De Clercq, 2004; Do Nascimento *et al.*, 2010):

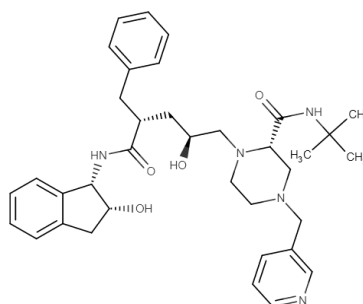


Figura 12- Estrutura química da molécula de Indinavir (adaptada de De Clercq, 2004).

3.12. Outros fármacos com atividade antiviral

3.12.1. Daclatasvir

Daclatasvir é um agente antiviral de ação direta contra o vírus da hepatite C (VHC) usado para o tratamento da infecção crônica do genótipo 1 e 3. A Hepatite viral do tipo C (HVC) é uma doença hepática infecciosa causada pelo VHC. O VHC é um vírus de ARN de cadeia simples que é classificado em nove genótipos distintos, sendo o genótipo 1 o mais comum nos Estados Unidos e que afeta 72% de todos os pacientes com HVC crônica. Também está descrito que o Daclatasvir além de bloquear a síntese de ARN viral intracelular interfere também na ‘assemblagem’ e egresso do viriões *in vivo*. É comercializado sob o nome de Daklinza e foi recentemente aprovado pelo FDA em julho de 2015. A fórmula química de Daclatasvir é $C_{40}H_{50}N_8O_6$ e possui uma massa molecular de $738,88 \text{ g mol}^{-1}$, apresentando seguinte estrutura química (Figura) (Bunchorntavakul e Reddy, 2015; Kayali e Schmidt, 2014):

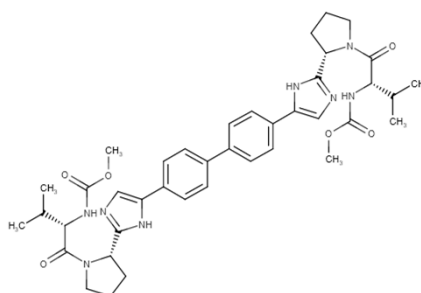


Figura 13- Estrutura química da molécula de Daclatasvir (adaptada de Pubchem, acedido a 15 agosto 2017).

3.12.2. Ciclosporina A

A Ciclosporina A é um agente imuno-supressor que tem sido sugerido como antiviral para o VIH-1 atuando indiretamente ao limitar a ativação das células T, e diretamente por interferência no processamento das poliproteínas de Gag, resultando na produção de partículas não infecciosas. A Ciclosporina A apresentasse pela fórmula química $C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$, com um peso molecular $1202.61 \text{ g mol}^{-1}$, e com a estrutura química apresentada na Figura (Wiesinger e Borel, 1980; Matsuda e Koyasu, 2000; Rizzardi *et al.*, 2002):

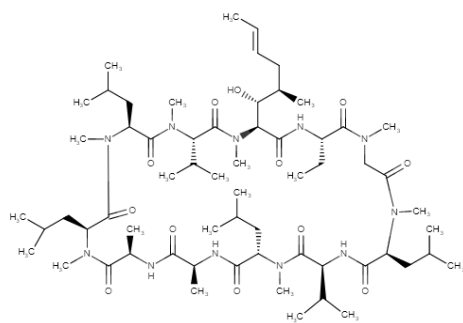


Figura 14- Estrutura química da molécula de Cyclosporina A (adaptada de Selleckchem, 15 agosto 2017).

3.13. Resistência antiviral

A resistência antiviral pode ser definida como uma modificação no vírus, significando que este já não é suscetível à droga habitualmente utilizada no tratamento viral. A resistência antiviral decorre de alterações aleatórias no material genético do vírus (o genoma) durante a replicação (Asahchop *et al.*, 2012).

Até à data não existem outros estudos de resistência antirretroviral além dos conhecidos para o VIH. Assim, utilizamos os conhecimentos obtidos para o VIH como referência. Contudo, a resistência aos medicamentos antirretrovirais é muitas vezes inevitável devido à natureza propensa a erros da TR e à ausência de uma função de revisão da transcrição (Roberts *et al.*, 1988). No caso do VIH, a seleção das estirpes resistentes à droga é facilitada pela elevada taxa de eventos de recombinação mediadas pela TR e pelo número total de ciclos de replicação que ocorrem num indivíduo infetado. As mutações associadas à resistência são localizadas na TR, ou seja, nos genes que codificam alvos antirretrovirais, resultando na produção de TR com modificações na estrutura e na sua função (Das e Arnold, 2013a; Das e Arnold, 2013b; Spira *et al.*, 2003).

Estas resistências podem ocorrer por: substituições simples – SNV, Single Nucleotide Variation - mutações pontuais que resultam da substituição de um único nucleótido; inserções e/ou deleções – INDELs- também conhecidas por “frameshift”, que são mutações decorrentes da adição ou remoção de um ou mais nucleotídeos, respetivamente. As mutações pontuais podem ser definidas em diversos tipos e envolver alterações num único ou em vários nucleotídeos. As mutações podem ser silenciosas ou sinónimas, *missense* ou não sinónimas, *nonsense* e *frameshift*. As mutações silenciosas resultam da substituição de um par de bases por outro, que leva à formação de um códon diferente, que continua, no entanto, a codificar o aminoácido original. Não se observa

qualquer alteração na função da proteína. As mutações *missense* resultam da substituição de um par de bases por outro, levando à formação de um codão que codifica um aminoácido diferente do original. Se o codão obtido por mutação, no entanto, codificar um aminoácido quimicamente semelhante ao original, não se vão detetar grandes alterações na função da respetiva proteína. Assim sendo, numa mutação deste tipo, pode obter-se uma proteína com função alterada ou não. As mutações *nonsense* resultam da substituição de um par de bases por outro, que leva à formação de um codão stop, à terminação prematura da cadeia polipeptídica sendo a respetiva proteína – proteína truncada – normalmente não funcional. Mutações *frameshift* resultam de adições ou eliminações de pares de bases que provocam desfasamento das *frames* obtendo-se uma sequência de aminoácidos diferente da original a partir do local onde se deu a alteração (Menéndez-Arias, 2009).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios laboratoriais descritos no presente capítulo foram realizados exclusivamente no Laboratório Equigerminal, SA.

4.1. Modelos celulares

Os modelos celulares utilizados neste estudo foram as células Dérmicas Equinas (ED) do tipo fibroblástico, e as células do tipo macrofágico de equino (EML). As células ED ou NBL6 com a referência ATCC®CCL57™ foram obtidas da American Tissue Culture Collection (ATCC). A linha celular EML, (*equine macrophage-like*) foi obtida a partir de monócitos extraídos do sangue periférico de cavalos (Carvalho *et al.*, 2008). Estas duas linhas celulares são do tipo aderente e necessitam de um método de dissociação celular enzimático para a sua propagação. Para tal utilizamos a tripsina, uma enzima com propriedade proteolítica que hidrolisa cadeias peptídicas nos radicais lisil-arginil formando terminações de clivagem éster e amida. Para que não ocorra a lise celular, devido à inespecificidade desta enzima, a incubação celular com a tripsina deve ocorrer apenas o tempo suficiente para destacar as células, devendo ser inativada imediatamente através da adição de meio complementado com soro bovino.

As células foram propagadas em frascos T175 e incubadas a 37 °C e 5% de CO₂ até uma confluência de 90-95%. O processo de passagem de células iniciou-se pela remoção do meio de cultura seguido por duas lavagens com 10-15 mL de Dulbecco's PBS

(solução salina tamponada com fosfato sem sais inorgânicos) e dissociação celular com tripsina. A incubação da tripsina ocorreu até a libertação das células dos frascos. A dissociação celular foi monitorizada através da visualização das células ao microscópio ótico (MO). Às células não aderentes foi adicionado meio completo (MC). As células foram passadas numa diluição 1:2 ou 1:3 para um novo frasco. O MC foi composto por DMEM (Hyclone), (DMEM/High glucose/Phenol Red with L-glutamine), suplementado com 10% Soro fetal bovino (FBS) (Hyclone), 1% de Penicilina-Estreptamicina (Gibco, Life Technologies), 20 mM de HEPES (Hyclone) e 1% de Glutamax (Gibco, Life Technologies), uma solução do dipéptido L-alanil-L-glutamina a 200 mM. Após passagem as células foram novamente incubadas a 37°C e 5% CO₂ e o procedimento de passagem repetido para propagação celular.

4.2. Estudos *in vitro* de infecção com VAIE

Neste estudo utilizamos a estirpe viral VAIE_{WYO} obtida da ATCC com a referência VR-778. Esta estirpe viral é relatada como sendo um vírus patogénico (Malmquist e Barnett, 1973), no entanto, quando replicada em células ED tem efeitos citopáticos (CPE) muito ligeiros. O VAIE_{WYO} foi adaptado às células ED durante várias dezenas de passagens do vírus de modo a permitir a produção de grande número de partículas virais.

A infecção de VAIE foi efetuada com 1 MOI (multiplicidade de infecção) em meio completo (MC). O meio de infecção foi mantido por 3h a 37 °C e 5 % de CO₂. Após as 3 horas o meio de infecção foi removido e adicionado meio fresco. Após 5 a 7 dias foram efetuadas recolhas de sobrenadantes para a quantificação viral através de um ensaio de RT qPCR. As partículas virais obtidas e quantificadas foram alíquotadas e armazenadas a -80 °C.

4.3. Quantificação de partículas virais de VAIE_{WYO}

A quantificação das partículas virais de VAIE_{WYO} foi efetuada através do ensaio RT-qPCR em tubo único, utilizando a Superscript III como Transcriptase Reversa (Life Technologies), a supermix SsoFast™ EvaGreen® (Bio-Rad) e sondas específicas para a região da *pol* do VAIE_{WYO}. O protocolo RT-qPCR foi realizado de acordo com as instruções do fabricante no equipamento CFX96 da Bio-Rad.

Em paralelo e nas mesmas condições foi efetuada uma curva padrão obtida a partir de 9 diluições seriadas de 10 vezes de um plasmídeo controlo contendo um número conhecido de cópias do gene pol, o plasmídeo pCR4-VAIE_{pol}. O número de cópias do gene pol foi obtido a partir da concentração de ADN deste plasmídeo quantificado previamente por yDrop (Thermo Scientific™ yDrop™ Plate). O cálculo do número de moléculas μL^{-1} em cada diluição da curva padrão foi obtida de acordo com a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Xg}/\mu\text{L ADN}}{n^{\circ}\text{pares bases do plasmídeo (bp)}} \times 6,022E^{23} = Y \text{ moléculas}/\mu\text{L}$$

Os cálculos da curva padrão foram obtidos através do programa do Bio-rad CFX Manager 3.1.

4.4. Ensaios antivirais *in vitro* com várias drogas

Neste estudo foram avaliados vários antivirais, aprovados pela FDA e EMA, tais como Ciclosporina A (agente imunossupressor), Daclatasvir (inibidor da NS5A do VHC), Darunavir (IP de VIH-1), Indinavir (IP do VIH-1), Adefovir dipivoxil (NITR), Tenofovir (NITR), Zidovudina (NITR) e Nevirapina (NNITR).

As drogas foram dissolvidas em DMSO numa concentração stock de 100 mM. A concentrações testes foram obtidas através de diluição seriadas em MC da concentração stock. As células ED foram plaqueadas em placas de 96 poços de modo a obter uma confluência de 90-95% em 24 h-72 h. Quando confluentes as células foram pré-tratadas com 1 e 10 μM das respetivas drogas durante uma hora em triplicados.

A infeção das células foi efetuada com 3 MOI de VAIE_{WYO} durante 2 horas e após o tratamento com a droga antiviral na presença das mesmas. Após as 2 horas de infeção o meio foi retirado e substituído por MC e drogas frescas, permanecendo incubadas durante 20 dias. Pelo método RTqPCR foi possível avaliar a replicação VAIE_{WYO} e a quantificação das partículas virais presentes nos sobrenadantes celulares dos dias 5, 10, 15 e 20 pós-infeção. Para quantificação das partículas virais usou-se uma curva padrão de ADN de um plasmídeo de VAIE_{WYO} conforme acima descrito. As amostras dos sobrenadantes das diferentes drogas e as diferentes concentrações foram testadas em triplicados.

4.5. Ensaios antivirais para determinação da CC₅₀ e IC₅₀

Células ED confluentes (90-100%) foram pré-tratadas com a respetiva droga com as respetivas concentrações em quintuplicados durante 1 hora. Como controlo de infeção utilizaram-se células sem tratamento com droga antiviral e sem infeção - a condição Mock, e células infetadas com VAIE_{WYO} e não tratadas com droga antiviral – a condição NT. Após pré-incubação com droga antiviral procedeu-se à infeção com VAIE_{WYO} durante 2 horas, sendo a droga mantida durante a infeção. Após a infeção, foi removido todo o sobrenadante, as células foram lavadas com DPBS e adicionou-se meio completo fresco com as devidas concentrações teste. Os ensaios de replicação viral foram efetuados ao longo de 5 a 20 dias, acordo com o especificado para cada ensaio.

A replicação de VAIE_{WYO} foi avaliada pela quantificação das partículas virais obtidas no sobrenadante das células conforme especificado acima na secção 4.3.

4.5.1. Determinação da IC₅₀ para o Adefovir dipivoxil (ADD)

A determinação da concentração inibitória de 50%, IC₅₀, do Adefovir dipivoxil (ADD) foi efetuada em células ED de acordo com o descrito acima para os ensaios antivirais.

A avaliação do efeito do antirretroviral na replicação viral VAIE_{WYO} permitiu determinar o valor IC₅₀ de ADD. As células ED foram plaqueadas 24 a 48 horas antes dos ensaios numa placa de 96 poços (1×10^5 células/cm²). As células ED confluentes (90-100%) foram lavadas duas vezes com DPBS para a remoção de células não aderentes, ficando prontas para iniciar o ensaio. As células ED confluentes foram incubadas com 150 µL de MC e pré-tratadas com diferentes concentrações de Adefovir dipivoxil a partir de um stock de 100 mM em 100 % DMSO (Selleckchem, Alemanha). O pré-tratamento ocorreu durante 1 hora com diferentes diluições seriadas de Adefovir dipivoxil: 10000; 5000; 2500; 1250; 625; 312.5; 250; 156.25; 78.13; 39.06, 19.53 e 0,01 nM. Foram utilizados quintuplicados para cada diluição. Após pré-tratamento procedeu-se à infeção com VAIE_{WYO} a 1 MOI durante 2 horas. A droga foi mantida durante a infeção. Tal como especificado na secção 4.5 foram utilizadas duas condições controlos, a condição Mock e a condição NT, células infetadas não tratadas. Após infeção, as células foram lavadas com DPBS para remover os vírus em solução e meio completo fresco com a respetiva diluição de ADD foi adicionado em cada poço correspondente. O número de partículas virais mL⁻¹ de sobrenadante de células foi rastreado ao fim de 7 dias de incubação. Os

sobrenadantes das células dos quintuplicados foram recolhidos numa 'pool' e as quantificações efetuadas conforme descrito na secção 4.3 em triplicado através da técnica RTqPCR. Os resultados obtidos foram analisados software Prism GraphPad Prism 6.05 utilizando a função de quatro parâmetros (log (droga) versus resposta assumindo um declive variável.

4.6. Ensaios de viabilidade celular e/ou citotoxicidade

Nos testes de viabilidade celular utilizou-se o reagente PrestoBlue™, uma solução à base de resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido). As células vivas reduzem este composto para resafurina, processo que é acompanhado pela alteração da coloração, a solução passa de azul a avermelhado, acompanhado com o ganho de fluorescência. Por isso, medidas de fluorescência e/ou de absorbância da solução dão uma indicação da atividade metabólica celular e, consequentemente, da presença de células viáveis, quando comparados com uma solução controlo. A análise foi realizada no leitor ELISA Multiskan Go (Thermo Scientific). A quantificação foi realizada pela medição da absorbância com os filtros 530 nm (excitação) e 590 nm (emissão). Os valores de absorbância são proporcionais ao número de células viáveis presentes no meio.

Os ensaios de viabilidade celular permitem obter os valores de CC₅₀, ou seja, a concentração citotóxica que inibe 50 % do crescimento celular. As células foram plaqueadas nas microplacas de 96 poços 24 a 48 horas antes do início dos testes até atingirem uma confluência de 90-100 %. Depois de atingida a confluência desejada, as células foram lavadas duas vezes com DPBS para a remoção de células não aderentes. Foram plaqueadas 1×10^5 células/cm² numa microplaca de fundo plano utilizando-se quintuplicados para cada condição. O número de células por mL foi obtido através da contagem celular numa câmara de Neubauer. As células foram incubadas em meio completo sem fenol red e o reagente PrestoBlue adicionado às culturas celulares no final da incubação com a droga. No ensaio do PrestoBlue foram efetuadas as seguintes condições controlo: o controlo MC com células - em que só foi adicionado meio completo sem fenol red às células, e outro controlo MC - contendo apenas meio completo sem fenol red e sem células. A incubação com o reagente PrestoBlue ocorreu durante 3 a 24 horas a 37 °C e 5 % CO₂ de acordo com as instruções do fabricante. Após incubação os valores de absorbância foram determinados num leitor de ELISAs Multiskan Go.

Todos os valores de absorbância obtidos foram normalizados através da subtração dos valores de absorbância obtidos para o meio completo sem fenol red e sem células.

4.6.1. Determinação da CC₅₀

Os estudos de citotoxicidade foram efetuados usando a mesma metodologia descrita para os estudos de viabilidade celular, ou seja, através da utilização do reagente PrestoBlue. Nestes estudos de citotoxicidade foi determinada a CC₅₀. Uma vez que as drogas antivirais foram parcialmente dissolvidas em DMSO determinou-se também a CC₅₀ para o DMSO.

4.6.1.1. Determinação da CC₅₀ do DMSO

Para determinação da CC₅₀ do DMSO utilizaram-se 16 concentrações diferentes de 3.949; 2.633; 1.755; 1.170; 0.780; 0.520; 0,347; 0.231, 0.154; 0.103; 0.068, 0.046; 0.030; 0.020; 0.014; 0.009 %. O DMSO foi diluído a partir de uma solução 100 % em meio completo sem fenol. As diluições foram adicionadas à microplaca de 96 poços contendo células onde permaneceram em incubação durante 8 dias numa câmara húmida a 37 ° C e 5 % CO₂. Ao fim dos 8 dias a viabilidade celular foi avaliada através da adição do reagente PrestoBlue™ (MolecularProbes, Invitrogen) e incubação durante 24 horas numa câmara húmida a 37 ° C e 5 % CO₂. Após as 24 horas a absorbância foi lida a 570 nm num leitor ELISA Multiskan Go (Thermo Scientific). Os valores de absorbância obtidos foram normalizados, com remoção dos valores de absorção basal do reagente Prestoblué obtidos para a condição controlo MC, numa incubação de 24 horas sem células. Os valores normalizados foram analisados pelo software Prism GraphPad Prism 6.05.

4.6.1.2. Determinação da CC₅₀ de ADD em células ED

A CC₅₀ do ADD (Selleckchem, Alemanha) foi obtida através da análise de 11 concentrações diferentes de: 2000 (2 % DMSO); 230.66; 153.77; 102.52, 68.34; 45.56; 30.37; 20.25; 13.50; 9.00; 6.00; 4.00 µM de ADD em quintuplicados para cada concentração. As diluições seriadas foram efetuadas em MC sem fenol red e adicionadas num volume de 150 µL nos respetivos poços da microplaca 96 poços, permanecendo em incubação durante 6 dias numa câmara húmida a 37 ° C e 5 % CO₂. A viabilidade celular foi avaliada de acordo com o descrito acima para a viabilidade celular e determinação de CC₅₀ do DMSO.

4.6.1.3. Determinação da CC₅₀ de ADD em células EML

A citotoxicidade do ADD (Selleckchem, Alemanha) foi testada em células EML (10⁵ células / cm²) em microplacas de 96 poços. De modo semelhante ao descrito acima para a determinação da CC₅₀, as células EML foram tratadas com seis concentrações diferentes de 45.56; 68.34; 102.52; 153.77; 230.66 e 2000 µM de ADD. Estas concentrações foram obtidas a partir de diluições seriadas de um stock de 100 mM (100% de DMSO) em MC. Após tratamento as células permaneceram em incubação com esta droga durante 7 dias numa câmara húmida a 37 ° C e 5 % CO₂. O cálculo da CC₅₀ foi efetuado com base nos valores de absorbância obtidos no ensaio de viabilidade celular com o reagente PrestoBlue, tal como acima mencionado na secção 4.6.

4.7. Índice de Seletividade

O índice de seletividade (IS) dos antivirais foi obtido a partir do cálculo da razão entre a CC₅₀ e a IC₅₀ de acordo com a seguinte fórmula:

$$IS = \frac{CC_{50}}{IC_{50}}$$

4.8. Análise molecular do VAIE

4.8.1. Extração do ARN viral

A extração e purificação de ARN viral foi efetuada através do Kit PureLink™ Viral RNA/DNA Mini Kit (Invitrogen). O protocolo da extração e purificação foi realizado de acordo com as instruções do kit. As amostras de ARN foram eluídas em água.

4.8.2. Amplificação e sequenciação de variantes genéticas

O gene da TR foi amplificado em partículas virais de VAIE_{WYO} produzidas na ausência ou presença de ADD. Para os estudos de resistência genética foram utilizadas partículas virais obtidas de ensaios antivirais com 12, 24 e 33 dias de incubação com concentrações de ADD próximas da IC₅₀.

Para o estudo da variação genética da TR foram utilizados 4 pares de sondas específicas de forma a obter fragmentos de PCR sobrepostos (a vermelho na Figura) de todo o gene da TR (com um tamanho de 1,599 pb) com uma boa cobertura (*'coverage'*). Os 4 fragmentos de PCR foram denominados de fragmentos A, K, P e EIB.

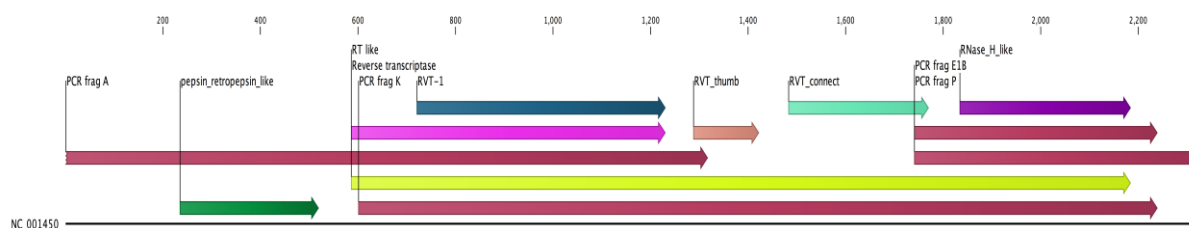


Figura 15- Diagrama esquemático dos fragmentos de PCR amplificados para sequenciação do gene da TR. (Fonte: CLC Genomics Workbench)

O fragmento de PCR A com 1345 pb cobre a região 5' da TR, o fragmento K com um tamanho de 1639 bp cobre a totalidade do gene TR, no entanto devido ao facto da qualidade de sequenciação de ADN nas regiões terminais 5' e 3' dos fragmentos ser de menor qualidade as sequencias deste fragmento foram maioritariamente utilizadas para cobrir a região intermédia do gene da TR. O fragmento P com 1880 pb cobriu a região 3' da TR. Devido à grande importância dos domínios da região 3' do gene da TR utilizou-se também outro pequeno fragmento, o EIB, com 499pb, de modo a obter uma melhor cobertura desta região.

Os fragmentos de TR foram obtidos através de RT-PCR convencional num único tubo, utilizando as enzimas Superscript III e Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen). O protocolo de amplificação foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Após a amplificação dos fragmentos de PCR acima mencionados, o seu correto tamanho em pares de base (pb) foi confirmado por eletroforese horizontal em gel de 0.8% de agarose. Os fragmentos de PCR foram depois processados e enviados para sequenciação por Sanger em regime de outsourcing na empresa MacroGen (Netherlands). A análise das sequencias obtidas foi efetuada utilizando o software CLC Genomics Workbench (CLC Bio, Qiagen)

4.8.3. Análise do efeito do ADD na variabilidade genética da TR

De forma a avaliar a predisposição do antiviral ADD a resistências procedeu-se a análise comparativa das sequências genéticas obtidas para a TR do VAIE submetido a pressão do antirretroviral ADD, designadas como WYO ADD, com as sequências obtidas para a mesma região do VAIE não submetido a tratamento, designadas como WYO NT.

A informação detalhada das sequências da TR do WYO NT e WYO ADD obtidas da sequenciação por Sanger dos fragmentos A, K, P e EIB encontra descrita no anexo V e anexo VI respetivamente.

As sequências Sanger obtidas foram importadas para o programa CLC Genomics Workbench de acordo com o manual de instruções. Para análise de sequências foram utilizadas as ferramentas de *trimming*, procura de *primers*, entre outras. Para obter uma cobertura semelhante do WYO NT e do WYO ADD foram analisadas 133 sequências de WYO NT e 106 de sequências WYO ADD.

Foi efetuada a análise de “*trimming*” a todas as sequências. Esta ferramenta consiste no corte de seções de sequências obtidas com baixa qualidade. A sequência cortada ou “*trimmed*” é uma região que é ignorada quando são usadas outras ferramentas de análise de sequências, como exemplo de “*assembly*” (Figura). Neste estudo, o “*trimming*” foi realizado com um nível de qualidade de 0,01 de modo a obter sequências de elevada qualidade. Quando mais baixo o nível de qualidade utilizado no ‘*trimming*’ maior é a qualidade das sequências obtidas. O valor de ‘*trimming*’ aconselhado para a maior parte dos casos é de 0.05, no entanto, de modo a identificar com segurança os variantes genéticos utilizamos um nível de ‘*trimming*’ mais exigente de 0.01.

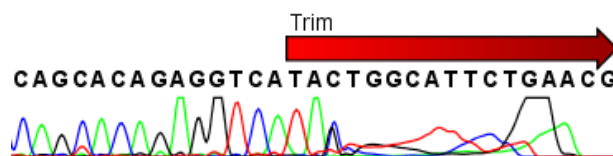


Figura 16- Exemplo da análise do ‘*trimming*’ numa sequência. (Fonte: Manual CLC Genomics Workbench)

Após o “*trimming*”, as sequências WYO NT e WYO ADD foram sujeitas à análise em paralelo utilizando a ferramenta do CLC Genomics Workbench de ‘*Assembly sequences to reference*’, ou seja, fizemos a “*assembly*” das sequências obtidas de WYO NT à sequência de referência do VAIE, o NC_001450. Em paralelo fizemos o mesmo procedimento para as sequências obtidas para o WYO ADD. Depois de obtidas as duas “*assembly*” utilizamos a ferramenta *Track Tools* de forma a converter as duas assemblagens obtidas em ‘*tracks*’, uma para WYO NT e outra WYO ADD, ou seja, em dois mapeamentos distintos.

Após obtenção dos mapeamentos para WYO NT e WYO ADD utilizamos a ferramenta do CLC Genomics Workbench denominada ‘*Resequencing Analysis*’ e utilizamos as seguintes funções desta ferramenta: a) a análise de cobertura (*coverage analysis*) da TR; b) a detecção básica de variantes (*Basic Variant Detection*) e c) análise

estatística para zona alvo (*creating statistics for Target region*) para os mapeamentos obtidos para WYO NT e WYO ADD.

A análise de cobertura, consiste no número de leituras de sequências que contribuem para uma certa região da montagem. Esse número corresponde ao número total de sequências analisadas para cada região do gene da TR.

Para detecção de variantes foi efetuada a detecção básica de variantes admitindo uma ploidia igual a 8, (o valor máximo permitido pelo software) uma cobertura mínima da região igual a 10 e uma frequência mínima de 5 %. A análise foi realizada com base no alinhamento total na zona de seleção, contendo zonas antes e depois da TR, de forma a utilizar o maior número de sequências obtidas. Após esta análise foi efetuada uma seleção específica, só para localização da TR, e foi novamente analisado variantes. Foi efetuada uma nova análise dos variantes filtrados da região da TR, esta permite ter uma maior sensibilidade e especificidade na análise dos variantes. Os parâmetros utilizados nesta análise foram iguais aos descritos anteriormente.

A análise estatística da cobertura foi efetuada tendo como alvo a região/gene que codifica para a TR do mapeamento do WYO NT, bem como para o mapeamento WYO ADD. Nesta análise estatística utilizaram-se os parâmetros indicados por defeito, com uma cobertura mínima de 30 para a região alvo.

Depois de obtidas as análises acima citadas foram criadas faixas com informações - “*track list*” – de modo a representar sumariamente todos os dados obtidos.

Por último retirou-se a sequência de consenso obtida no mapeamento WYO NT e WYO ADD e efetuou-se o alinhamento destas duas sequências consensos, permitindo deste modo observar de um modo geral as diferenças entre as sequências consenso obtidas nos dois mapeamentos do gene que codifica para TR.

4.8.4. Geração de um banco genómico de VAIE

Para a análise genética foi gerado um banco de sequências de VAIE obtido a através do NCBI-GENBANK (NCBI-GENBANK- EIAV, 4 setembro 2017). Neste banco genómico de VAIE foram incorporadas diferentes sequências provenientes de genomas oriundos de ARN ou ADN proviral de estirpes adaptadas em laboratório, clones moleculares ou isolados primários. Estas sequências foram selecionadas de acordo com

um tamanho, ou seja, apenas foram admitidas sequências com um tamanho superior a 7kb, de modo a obter apenas sequências completas de VAIE.

As sequências obtidas foram catalogadas de acordo com: a) a sua origem geográfica, b) tipo de amostra da qual foi isolado, ou seja, ARN genómico, ADN genómico ou ADN genómico proviral, c) laboratório proveniente e d) publicação científica associada.

O banco genómico de VAIE e as análises genéticas foram efetuadas com o auxílio do software CLC Genomics Workbench 10.0.1. No banco genómico de VAIE gerado neste software foram guardadas todas as informações provenientes do Genbank, tal como o número de referência, o tamanho, o tipo de estrutura molecular, tipo de amostra e origem da sequência.

A sequência de referência de VAIE_{WYO}, o NC_001450, foi devidamente anotada com as regiões e domínios da TR (ver anexo I), bem como com as anotações dos fragmentos analisados neste estudo. Estas anotações foram efetuadas no CLC Genomics Workbench utilizando as ferramentas de anotação de acordo com o manual (QIAGEN, 2017).

4.8.5. Alinhamento e árvore filogenética de sequências de VAIE

Foi efetuado o alinhamento de 47 sequências utilizando a ferramenta de alinhamento de sequências do CLC Genomics Workbench. De seguida utilizamos a ferramenta de “criação de alinhamento ou árvore filogenética” seguindo os passos do tutorial (QIAGEN, 2017). Do alinhamento das sequências resultou uma sequência consenso, uma sequência “artificial” única obtida a partir da informação das sequências alinhadas que reflete as zonas mais conservadas entre todas as sequências.

Com base no alinhamento das 47 sequências de VAIE com tamanho superior a 7kb foi criada uma árvore filogenética no formato de um filograma radial para o VAIE. Neste filograma as sequências foram identificadas com diferentes cores de acordo com o seu país de origem. Recorreu-se à ferramenta de criação de árvores filogenética- “*Maximum Likelihood Phylogeny*” e utilizou-se o método de *Neighbor Joining* para construção das árvores filogenéticas. Este método é o mais adequado para árvores com diferentes taxas de variabilidade genética. Para o parâmetro de medição da distância dos nucleotídeos utilizou-se o definido por Jukes-Cantor (Jukes e Cantor, 1969), que assume frequências iguais para as bases e para as taxas de substituição. Foi selecionado o parâmetro de análise da taxa de variação genética, que consiste na análise de taxas de

substituição variáveis entre as zonas individuais nucleotídeos no alinhamento e da variação de taxa de inclusão de acordo com modelo descrito por Yang (Yang, 1994). Foram utilizados os valores padrão proposto pelo programa, para a taxa de variação com o valor de 4 (número de taxa de substituição). No parâmetro estimado usou-se o valor de 1.0 proposto por defeito pelo programa. Este parâmetro foi estimado de acordo com o princípio de semelhança máxima (Felsenstein, 1981). Por último, foi feita a análise “*bootstrap*” que permite avaliar a confiabilidade das árvores realizadas pelo CLC Genomics Workbench. O valor de *bootstrap* é incorporado a cada nó, e esse valor é uma medida de confiança na subárvore. O valor padrão utilizado para *bootstrap* foi de 100 réplicas.

4.8.6. Mapeamento genético das sequências VAIE provenientes de diferentes origens e locais

De modo a tornar visível a variabilidade genética ao longo dos 7-8kb do genoma do VAIE utilizamos a ferramenta de ‘*Assembly to Reference sequence*’. Assim, as 47 sequências de VAIE foram alinhadas à sequência de referência do genoma VAIE_{WYO}, NC_001450. De seguida utilizou-se a ferramenta ‘*Track Tools*’ de modo a gerar gráficos com faixas informativas -*Track List*- que contêm toda a informação acerca da sequência de referência com as anotações das regiões, genes, proteínas, mapeamento de variantes, “*coverage*”, entre outras.

5. RESULTADOS

5.1. Ensaios antivirais para o VAIE

5.1.1. Efeito de vários antivirais na replicação do EIAV

No presente estudo foi analisado o efeito antiviral de vários fármacos aprovados pela FDA ou EMA, tais como os NITRs, Adefovir dipivoxil (ADD), Tenofovir, e Zidovudina, Nevirapina (NNITRs), Indinavir e Darunavir (IPs VIH-1), Daclatasvir (inibidor da NS5A do VHC) e Ciclosporina (agente imunossupressor) na replicação do VAIE.

Da análise dos resultados, apresentados na figura 17, podemos constatar que o ADD foi o antiviral mais eficaz no bloqueio da replicação de VAIE. Com uma dose única de tratamento desta droga, na concentração de $1\mu\text{M}$, aos dias 5, 10, 15 ou 20 p.i. não foram encontradas partículas virais, demonstrando - se uma diminuição drástica de 10^8 partículas virais mL^{-1} (p.v/mL) para 0 p.v/mL. No entanto, na concentração $10\mu\text{M}$ foi detetada a presença de partículas virais em 1 de 3 triplicados do dia 5 e do dia 15 pós-infecção (p.i). Foram detetadas 10 p.v/mL ao dia 5 p.i. e 100 p.v/mL ao dia 15. Nos restantes triplicados do dia 5, 10, 15 e 20 não foram encontradas quaisquer partículas virais. As diferenças observadas entre as células não tratadas e as infetadas foram estatisticamente significativas para $p < 0.001$.

Também foi observada uma diminuição significativa na replicação do VAIE na presença do Tenofovir e Zidovudina na concentração de $10\mu\text{M}$. Ao dia 15 e 20 p.i. o número de partículas virais/mL condição não tratado (NT) foi de 10^8 p.v/mL ao passo que na condição na condição Tenofovir e Zidovudina a $10\mu\text{M}$ foi 10^5 p.v/mL.

Os antivirais IPs também apresentaram um efeito significativo na replicação de VAIE. Na presença do antirretroviral Darunavir na concentração de $10\mu\text{M}$ após 15 dias p.i. observou-se uma diminuição significativa da replicação viral de 10^8 para 10^3 partículas virais mL^{-1} . Também aos 15 dias p.i o antiviral Indinavir a $10\mu\text{M}$ diminuiu significativamente a replicação viral de 10^8 para 10^4 partículas virais mL^{-1} .

Quanto ao antiviral Daclatasvir (inibidor da NS5A do VHC), observou-se uma ausência de partículas virais ao dia 5 p.i com $1\mu\text{M}$. Esta inibição só foi observada ao dia 5 p.i, mas ao fim dos 20 dias p.i não foi verificado qualquer efeito significativo deste antiviral na replicação do VAIE. Por último, não foi observado qualquer efeito significativo na replicação do VAIE na presença do antirretroviral Nevirapina (inibidor não nucleósido da transcrição reversa) e ciclosporina a (agente imunossupressor).

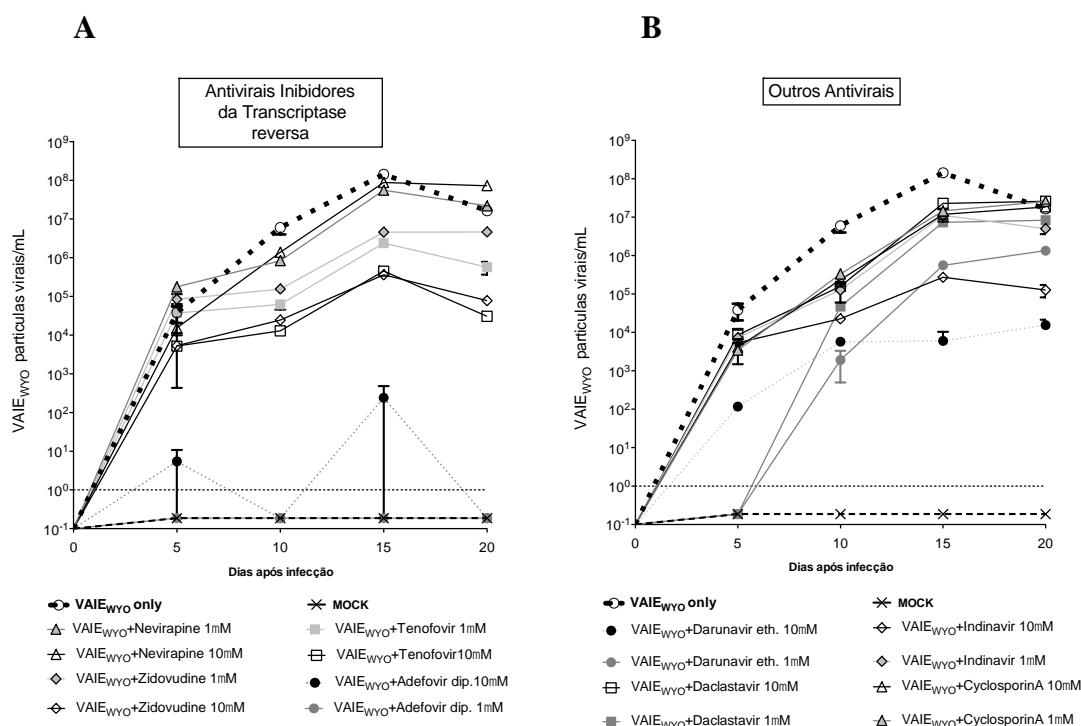


Figura 17- O Adefovir dipivoxil mostrou ter atividade antiviral contra o VAIE. Células equinas da derme infectadas com VAIE foram tratadas com Adefovir Dipivoxil, Tenofovir, Nevirapina, Zidovudina, Darunavir, Indinavir, Daclatasvir ou ciclosporina A em 1 ou 10 μ M até 20 dias após a infecção. As amostras foram rastreadas para o número de partículas virais/ml de sobrenadante de cultura de células utilizando técnicas de RTqPCR. O painel A mostra o efeito dos antivirais inibidores da TR (nucleosídeos ou não nucleosídeos) na replicação viral do VAIE. O painel B mostra os efeitos de antivirais inibidores da protease (Darunavir e Indinavir) bem como do Daclatasvir e Ciclosporina A. A quantificação das partículas virais foi obtida duma curva padrão com R^2 0.950, Eficiência 119% conforme indicado no anexo II).

5.1.2. Efeito do Adefovir dipivoxil (ADD) na replicação de VAIE

Os resultados acima apresentados mostraram que de todos os antivirais testados o ADD é o que possui a mais elevada atividade antirretroviral contra o VAIE. Deste modo, de seguida determinamos a IC_{50} deste antiviral.

5.1.2.1. Determinação de IC_{50} do Adefovir dipivoxil

Para uma melhor avaliação do efeito desta droga sobre a replicação viral do VAIE_{WYO}, em células ED, foi determinada a concentração necessária de ADD para inibir 50 % da atividade da replicação viral (IC_{50}). Para tal, foi efetuada uma curva padrão de um plasmídeo de VAIE, (ver anexo III) com valores estatisticamente significativos, um R^2 0.994 e Eficiência 96.56%, permitindo assim a quantificação das partículas virais produzidas.

A figura 18 mostra o efeito do Adefovir dipivoxil na replicação viral em células ED infectadas com VAIE_{WYO} ao fim de 7 dias de infecção. Os resultados analisados pelo software Prism utilizando a função de quatro parâmetros (log (droga) versus resposta assumindo uma inclinação variável) tornaram possível a determinação da IC₅₀. Nestas condições a IC₅₀ obtida para o ADD foi de 3.383 nM. Os valores obtidos foram estatisticamente significativos com 29 graus de liberdade, um R² de 0.9917 e um declive de Hill de 0.4492.

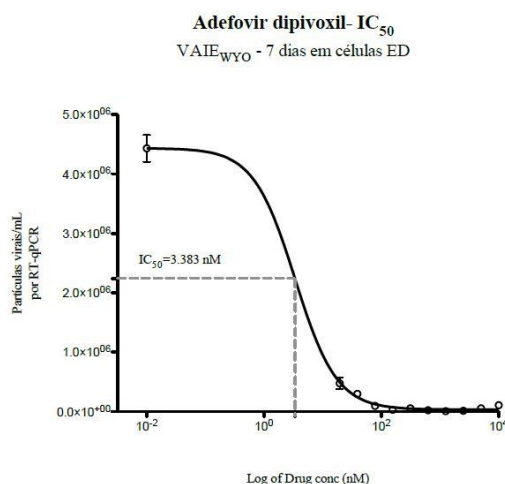


Figura 18- O efeito do Adefovir dipivoxil na replicação viral VAIE_{WYO} em células ED ao fim de 7 dias de infecção. Curva dose resposta do efeito da concentração do ADD na replicação viral após 7 dias de infecção determinada por técnicas de RT-qPCR. A curva dose resposta tornou possível a determinação de uma IC₅₀ de 3.383 nM.

5.1.2.2. Determinação da IC₅₀ de Adefovir dipivoxil (ADD) ao longo do tempo

De forma a avaliar o efeito de uma dose única de ADD ao longo do tempo foi avaliado o valor da IC₅₀ ao longo do ciclo de replicação do VAIE_{WYO}, ou seja, aos dias 12, 24 e 33 pós infecção (p.i). As condições deste ensaio foram semelhantes às indicadas acima para determinação IC₅₀ do ADD ao fim de 7 dias de infecção. Foi efetuada uma curva padrão para o cálculo das partículas viral mL⁻¹ de sobrenadante que obteve uma eficiência 72,7% e R² de 0.993 (ver anexo IV).

A figura 19 podemos observar o efeito de uma dose única de ADD na replicação viral em células ED com VAIE_{WYO} após 12, 24 e 33 dias de infecção. O valor de IC₅₀ obtido ao dia 12 foi de 20.01 nM como se pode ver na figura 19 A. Os dados apresentados foram estatisticamente significativos e obtidos com 20 graus de liberdade, um R² de 0,9904 e um declive de Hill de 0.1680. Ao dia 24 p.i o valor de IC₅₀ foi de 13.29 nM

(Figura 19 B) e dados obtidos com 21 graus de liberdade, um R^2 de 0.9999 e com um declive de Hill de 0.04274. Ao fim dos 33 dias de p.i o valor de IC_{50} obtido foi de 13.34 nM (Figura 19 C) com 22 graus de liberdade, um R^2 de 0.9997 e um declive de Hill de 0.06602.

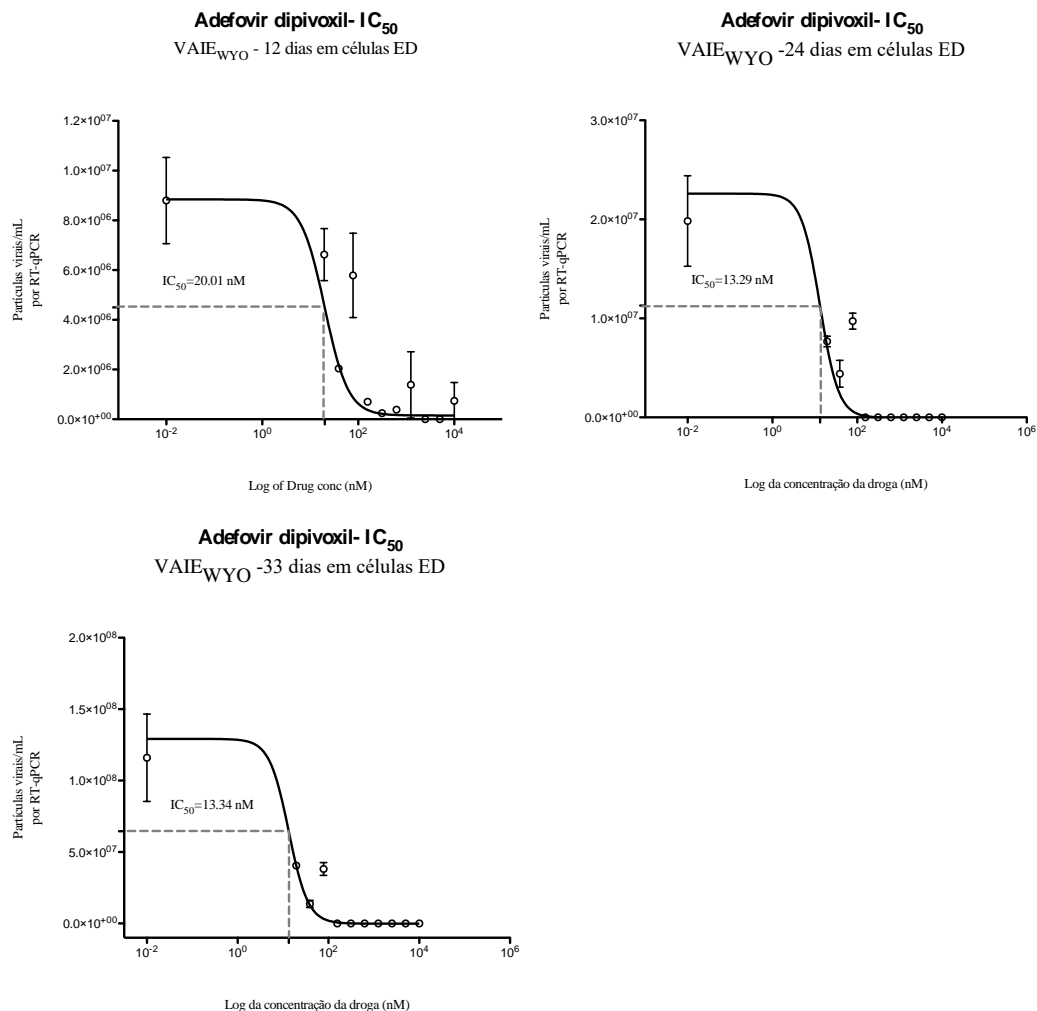


Figura 19- O efeito do Adefovir dipivoxil na replicação viral VAIE_{WYO} em células ED ao fim de 12 (painel A), 20 (painel B) e 33 (painel C) dias de infeção. A curva dose resposta do efeito da concentração do Adefovir dipivoxil na produção de partículas virais determinou uma IC_{50} de 20.01 nM ao fim de 12 dias (A) de 13.29 nM ao fim de 20 dias (B) e de 13.34 nM ao fim de 33 dias de infeção (C).

5.1.3. Determinação CC₅₀ do Adefovir dipivoxil (ADD) em células ED

Para determinação da citotoxicidade calculamos a CC₅₀ do ADD em células ED através da avaliação da viabilidade celular com diferentes concentrações de antirretroviral.

A figura 20 mostra a curva dose resposta de ADD na viabilidade das células, sob pressão de diferentes concentrações de ADD durante 6 dias. O ensaio de viabilidade celular determinou em células ED um valor de CC₅₀ para o ADD de 141.80 μ M. Os valores obtidos foram estatisticamente significativos com 55 graus de liberdade, um R² de 0.9602 e um declive de Hill de 2.427.

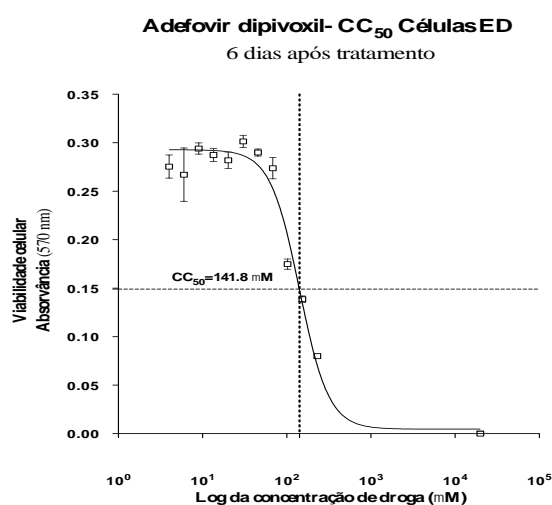


Figura 20- Citotoxicidade (CC₅₀) do Adefovir dipivoxil em células ED. Curva de dose resposta de viabilidade das células ED na presença de diferentes concentrações de ADD. O valor da CC₅₀ obtida para o ADD foi de 141.80 μ M de ADD, em células ED ao fim de 6 dias.

5.1.4. Determinação CC₅₀ do Adefovir dipivoxil (ADD) em células Macrofágicas-EML

De seguida avaliamos a citotoxicidade em células do tipo macrófago, EML, e determinamos a CC₅₀ do ADD nestas células.

A figura 21 mostra a curva dose resposta do efeito da pressão da droga durante 7 dias na viabilidade das células EML tratadas com diferentes concentrações de ADD. Os resultados foram analisados pelo software Prism utilizando a função de quatro parâmetros (log (droga) versus resposta assumindo um declive variável. Os ensaios de viabilidade celular mostraram que a CC₅₀ da droga foi 207.10 μ M. Os resultados obtidos foram

estatisticamente significativos e obtidos com 25 graus de liberdade, um R^2 de 0.9895 e um declive de Hill de 17.08.

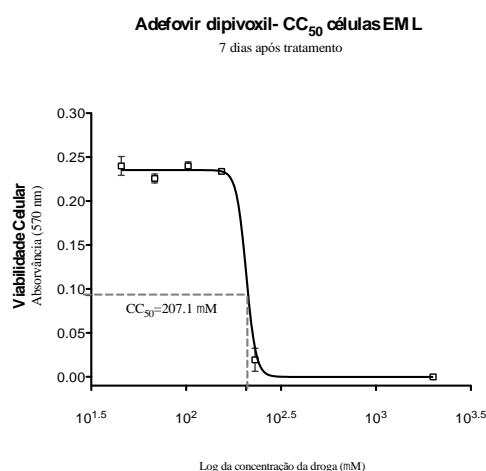


Figura 21- Citotoxicidade (CC_{50}) do Adefovir dipivoxil em células EML. Curva de dose resposta de viabilidade das células EML na presença de diferentes concentrações de ADD. O valor de CC_{50} obtido para o ADD foi de 141.80 μ M, em células EML tratadas durante 7 dias.

5.1.4.1. Determinação da CC_{50} do DMSO em células ED

Sendo o DMSO um excipiente do antirretroviral utilizado neste estudo foi necessário avaliar a viabilidade das células ED na presença de DMSO durante 8 dias. A figura22 apresenta a curva de dose de resposta das células ED sob pressão do DMSO. Os resultados demonstraram uma CC_{50} para o DMSO de 3.04 %. Os resultados foram estatisticamente significativos e obtidos com 58 graus de liberdade, um R^2 de 0.9739 e um declive de Hill de 0.3172.

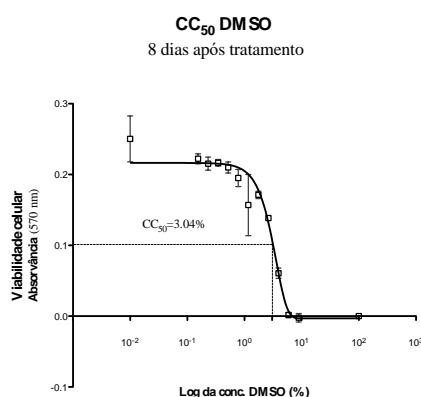


Figura 22- Avaliação da citotoxicidade do DMSO nas células ED – Determinação da CC_{50} . Curva de dose resposta de viabilidade das células ED na presença de diferentes concentrações de DMSO. O valor de CC_{50} para o DMSO foi de 3.04 % em células ED e 8 dias de incubação.

5.2. Determinação do Índice de seletividade Adefovir dipivoxil

Os valores obtidos da CC₅₀ e IC₅₀ permitiram o cálculo do índice de seletividade (IS) do ADD. Como é demonstrado na figura 23 o IS foi de 41.915,5 quando consideradas a CC₅₀ e IC₅₀ encontradas para o dia 7 de incubação em células ED. Este índice foi bastante elevado o que dá uma grande margem de segurança para prosseguirmos os estudos deste fármaco como um potencial antiviral.

CC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	IS (μM)
141,8	0,0034	41.915,50

Figura 23- Índice de seletividade do ADD. Valores de CC₅₀, IC₅₀ e IS do antirretroviral ADD contra o VAIE em células ED.

5.3. Análise de variantes genéticas da TR sob pressão do Adefovir dipivoxil (ADD)

A análise de variantes genéticas da TR sob pressão do ADD foi conseguida através da amplificação de 4 fragmentos de PCR sobrepostos da TR do VAIE_{WYO} tratado e não tratado com ADD. Estes 4 fragmentos sobrepostos de TR possibilitaram a cobertura total do gene da TR do VAIE. Nesta análise genética foi utilizado como controlo o VAIE_{WYO} não tratado, que designamos por WYO NT.

5.3.1. Análise da cobertura de WYO NT

A cobertura (“coverage”) do gene da TR do controlo WYO NT é analisado com maior detalhe na figura 24. Nesta figura apresentamos um quadro resumo que indica que apenas 119 sequências foram selecionadas com uma cobertura média de 48.6 do gene TR e regiões 5’ e 3’ flanqueadoras. Ao passo que região alvo analisada, o gene da TR, com um tamanho total de 1599bp, contou com um total de 86,059 bases mapeadas, uma cobertura média de cada base de 77.67 vezes, com uma especificidade de 90.25 %. Através da análise da cobertura mínima verificou-se que 100% das posições na região alvo foram cobertas pelo menos 10 X, 97.50% das posições foram cobertas 20X, e 79.80 % das posições na região alvo foram cobertas 40X.

	Cobertura Média	NºSequências da cobertura	Comprimento total das regiões alvo	Total de base mapeadas	Bases mapeadas na região alvo	Especificidade (%)	Cobertura mínima (%)			
							10x	20x	30x	40x
WYO NT	48,6	119	1,599	86,059	77,67	90,25	100,00	97,50	94,00	79,80

Figura 24- Análise da cobertura das 119 sequências para WYO NT. A região alvo (gene TR) com um comprimento total de 1599 bp, obteve uma cobertura média 77.67 vezes. A análise da cobertura mínima mostrou que 79,8 % das posições foi abrangida pelo menos 40 X.

5.3.2. Análise da cobertura de WYO ADD

Para o WYO ADD, a análise da cobertura (“coverage”) contou com 106 sequências e uma cobertura média de 40,6 (Figura 25). Da análise da cobertura para a região alvo, o gene TR, foi obtida uma cobertura média de 64,96. O que indica que as bases da região alvo foram mapeadas num total 64.96 vezes, com uma especificidade de 84.27 %.

A análise da cobertura mínima demonstrou que 100 % das posições na região alvo se encontraram cobertas pelo menos 10 vezes, 99.19% das posições foram cobertas no mínimo 20 vezes, 43.96 % das posições alvo apresentaram cobertura mínima de 40 vezes.

Os valores de cobertura obtidos de VAIE_{WYO} ADD foram semelhantes aos obtidos acima para o VAIE_{WYO} NT, com a exceção da cobertura mínima de 40X que foi superior no WYO NT.

	Cobertura Média	NºSequências da cobertura	Comprimento total das regiões alvo	Total de base mapeadas	Bases mapeadas na região alvo	Especificidade (%)	Cobertura mínima (%)			
							10x	20x	30x	40x
WYO ADD	40,6	106	1,599	77,08	64,96	84,27	100,00	99,19	85,00	43,96

Figura 25-Análise da cobertura das 106 sequências para WYO ADD. Através de um comprimento total de 1599 bp da região alvo (TR), obteve-se uma cobertura média de 40.6, mapeada 64.96 vezes para a região TR, com uma especificidade de 84.27 %. A análise da cobertura mínima de 43.96 % das posições foi abrangida com pelo menos 40 bases.

5.3.3. Variabilidade genética do VAIE_{WYO} NT

A análise da variabilidade genética do VAIE_{WYO} não tratado foi avaliada através da “assembly” à sequência de referência NC-001450 de 133 sequências obtidas na condição de WYO NT, ou seja, células infectadas VAIE_{WYO} há mais de 15 dias p.i. e não tratadas com o antiviral. Depois de alinhadas as 133 sequências foi efetuada a seleção da zona alvo da TR. Destas, apenas 119 sequências contribuíram para a análise de cobertura e de variantes. A figura 26 apresenta a análise da assemblagem da região selecionada, na

forma de “*track list*” gerada no CLC Genomics Workbench. A “*track list*” permite visualizar de forma global a “*assembly*” das sequências, as anotações das regiões, dos domínios, a cobertura e os variantes.

Da análise da figura 26 é possível verificar o mapeamento de 119 sequências WYO NT (Figura 26 (C)) para o gene da TR. No painel (M) da figura 26 é possível observarmos uma cobertura elevada de toda o gene da TR e uma cobertura mais baixa para as regiões que flanqueiam a TR, o gene da Protease na região 5’ e o gene DUTPase na região 3’.

A análise básica da detecção dos variantes das regiões sequenciadas (Figura 26 (F)), contendo a gene da TR e regiões flanqueadoras 5’ e 3’, permitiu detetar 50 variantes. Destes 50 variantes, 30 encontram-se no gene da TR e 20 estão localizados fora do gene da TR. Estando 14 variantes localizados na Protease e 6 variantes na DUTPase. Dois dos variantes da Protease foram encontrados no sitio ativo da protéase e do domínio RVP.

No gene da TR os variantes detetados foram os seguintes:

- domínio RT_like com 14 variantes, sendo 2 deles no sitio ativo da RVT-1;
- domínio RVT_Thumb com 3 variantes;
- domínio RVT_connect com 7 variantes;
- zona entre os domínios RVT_connect e RNase_H_like com 2 variantes;
- domínio RNase_H_like com 4 variantes.

Esta análise básica de variantes demonstrou uma grande variabilidade da região do gene pol do VAIE_{WYO NT}, ou seja, não sujeito a tratamento antiviral.

5.3.4. Análise detalhada dos variantes da TR - VAIE wyo NT

De seguida foi efetuado um filtro para análise detalhada dos variantes do gene da TR. Neste filtro foram apenas selecionados variantes com uma frequência > 5 %, uma qualidade superior a 20 e com valor mínimo de cobertura de 10. Depois de aplicado este filtro apenas 16 variantes foram detetados para o gene TR. Destes 16 variantes genéticos 14 foram variantes nucleotídeos simples (VNS), uma deleção e uma inserção.

Através da análise de variantes conseguimos identificar o alelo variante em relação ao alelo de referência e o número de fragmentos 'contáveis' que suportam o alelo analisado.

Desta análise ressaltam dois VNS com uma frequência de 100%: o VNS que resulta duma substituição de uma Timina por uma Adenina, T> A, no domínio RVT_thumb e na posição 1368; e um outro que resulta duma substituição de uma timina por uma citosina, T> C no domínio RVT_connect e posição 1639. Estes dois VNS apresentam uma qualidade média de 49.50 (T> A) e 50.46 (T> C) e não resultam em qualquer alteração nos aminoácidos, ou seja, representam variações silenciosas.

Seis (6) dos restantes VNS apresentaram uma frequência <23 % que podem ser analisados em pormenor na figura 27.

Além de VNS foram também encontradas deleções e inserções.

Uma deleção de uma adenina (A) em relação à referência na posição 1646 no domínio RVT_connect, apresentando uma frequência de 6.67 %, uma cobertura de 15 e com valor mínimo de forward/reverse de 0.00. Esta deleção provoca uma mutação de “frameshift” dando origem a um aminoácido Glutamina (Gln) na posição 549 da TR (ver anexo VIII).

Também no domínio RNase_H_like foi encontrada uma inserção de uma adenina (A) entre posição 2142 e 2143 em relação à referência. Esta inserção foi analisada com uma cobertura de 45, uma frequência de 8.89 %, um valor mínimo de forward/reverse de 0.00 e uma qualidade média de 30. A inserção de uma adenina (A) provoca uma mutação de “frameshift” dando origem a um aminoácido Glícina (Gly) na posição 716.



Figura 26- “Track list” do alinhamento das sequências WYO NT com a sequência de referência. Sequência consensos VAIE NT (A); Região TR (B); “Coverage” Cobertura máxima de 66 sequências na região da TR (C) e Alta e baixa cobertura (M); Alinhamento das 119 sequências VAIE_{WYO} NT (E); 50 Variantes da zona de seleção (F); Domínios da TR: RT_like (H), RVT-1 (I); RVT_Thumb (J), RVT_connect (K), RNase_H_like (G) e Locais ativos: RVP e RVT-1 (L).

Posição do Variante na Região	Tipo de variante	Nº	Base presente na sequência referência	Alelo	Nº de alelos	Cobertura do alelo	Frequência do alelo	Valor mínimo Forward/ reverse	Qualidade média	Região da TR- Domínios	Alteração da região codificante da sequência de referência	Alteração de aminoácidos
837	VNS	1	C	T	12	20	60.00	0.42	47.25	RT like	c.636C>T *	
880	VNS	1	G	A	3	38	7.89	0.00	43.33	RT like	c.679G>A	p.Glu227Lys
1173	VNS	1	A	T	15	42	35.71	0.47	48.53	RT_Like e RVT-1	c.972A>T *	p.Lys324Asn
1215	VNS	1	G	A	3	42	7.14	0.00	49.75	RT_Like e RVT-1	c.1014G>A *	
1297	VNS	1	A	G	37	41	90.24	0.16	47.38	RT_Like e local ativo RVT-1	c.1096A>G *	p.Met366Val
1353	VNS	1	G	A	34	56	60.71	0.38	46.44	RT_Like e local ativo RVT-1	c.1152G>A *	
1417	VNS	1	T	C	5	50	10.00	0.00	23.20	RT_Like e local ativo RVT-1	c.1216T>C	p.Trp406Arg
1543	VNS	1	A	G	32	49	65.31	0.50	49.50	RVT_thumb	c.1342A>G *	p.Ile448Val
1569	VNS	1	T	A	54	54	100.00	0.50	50.46	RVT_thumb	c.1368T>A *	
1840	VNS	1	T	C	37	37	100.00	0.43	43.57	RVT_connect	c.1639T>C *	
1847	Deleção	1	A	-	2	45	4.44	0.00	26.00	RVT_connect	c.1646delA	p.Gln549fs
1944	VNS	1	A	G	2	39	5.13	0.00	52.00	RVT_connect	c.1743A>G	
1956	VNS	1	T	G	16	53	30.19	0.19	48.94	RVT_connect	c.1755T>G *	
2006	VNS	1	G	A	10	44	22.73	0.20	40.70	Região Transcriptase reversa	c.1805G>A	p.Arg602Lys
2344	Inserção	1	-	A	4	45	8.89	0.00	30.00	RNase_H_like	c.2142_2143insA	p.Gly716fs
2354	VNS	1	A	G	36	39	92.31	0.36	43.36	RNase_H_like	c.2153A>G *	p.Tyr718Cys

Figura 27- Análise dos variantes filtrados para o gene TR de WYO NT. Foram detetados 16 variantes, 14 dos quais são variantes nucleotídeos simples, com uma deleção e uma inserção. Com 100% de frequência existem dois variantes nucleotídeos simples T> A no domínio RVT_thumb (posição 1368) e um T> C no domínio RVT_connect (posição 1639), não apresentado alteração nos aminoácidos. A deleção de um alelo (A) foi detetada na posição 1646 no domínio RVT_connect com uma frequência 6.67 %, provocando uma mutação de “frameshift” no aminoácido Glutamina (Gln). A inserção de um alelo (A) entre posição 2142 e 2143 no domínio RNase_H_like com uma frequência de 8.89%, provoca uma mutação de “frameshift” no aminoácido Glicina (Gly).

5.3.5. Variabilidade genética VAIE_{WYO} ADD

A variabilidade genética do VAIE_{WYO} ADD foi analisada através da “assembly” de 119 sequências de WYO ADD à sequência de referência do VAIE NC-001450. Tal como efetuado acima para a análise genética do WYO NT, foi efetuada uma seleção da região alvo, o gene da TR. Destas 119 apenas 106 sequências de WYO ADD foram usadas para a análise de cobertura e de variantes do gene da TR.

A figura 28 mostra a análise de “assembly” da região selecionada para TR, na forma de “track list”. Na análise da “track list” é possível observar que com as 106 sequências WYO ADD obtivemos uma cobertura máxima de 60 (Figura 28 (C)) para a região da TR. Na análise do painel (M) da figura 28 verificamos que ocorreu uma cobertura elevada no início e no final da região da TR e uma baixa cobertura na zona a montante da TR.

Da análise básica da deteção dos variantes (da zona selecionada contendo a região da TR), foram detetados 51 variantes, em particular na região do domínio RVT_thumb (Figura 28). Destes, 44 encontram-se na região da TR, 4 variantes localizam-se antes da região da TR (2 variantes para a mesma posição) e 3 variantes localizam-se fora da região da TR.

Na região da TR evidenciam-se os seguintes variantes:

- domínio RT_like com 16 variantes, sendo 1 deles no local ativo da RVT-1;
- domínio RVT_Thumb com 15 variantes;
- domínio RVT_connect com 5 variantes;
- entre os domínios RVT_Thumb e RVT_connect com 2 variantes;
- domínio RNase_H_like com 4 variantes.

5.3.6. Análise detalhada dos variantes do gene TR - WYO ADD

À semelhança do que foi efetuado para o WYO NT foi aplicado um filtro aos 44 variantes do gene da TR. Destes apenas 25 variantes apresentaram uma frequência >5%, uma qualidade superior a 20 e um valor mínimo de cobertura de 10X.

Dos 25 variantes filtrados (Figura 29), 11 são VNS, 12 são deleções e 2 são inserções. Através do filtro de variantes conseguimos identificar o alelo variante em relação ao alelo de referência e o número de fragmentos 'contáveis' que suportam o alelo analisado. A análise dos variantes identificou 5 VNS com uma frequência entre os 80 e

100% (nº fragmentos/cobertura). Destes 5 VNS, 2 variantes são *missense*, variações não sinónimas, que induzem alterações nos aminoácidos das proteínas. O VNS A> G no domínio RT_Like, posição 1096, resulta na alteração uma Metionina (Met – M) por uma Valina (Val – V), enquanto que o segundo variante no domínio RNase_H_like, posição 2153, causa a troca de uma Tirosina (Tyr – Y) por uma Cisteína (Cys – C)

Da análise comparativa entre as variações genéticas do WYO NT e do WYO ADD, verificamos que existem variantes comuns. Estes variantes estão assinalados com (*). A maioria dos variantes da condição WYO ADD resulta de deleções e apresentam baixa frequência. No entanto existem outros variantes com frequências significativas acima dos 25%.

Da análise da região do domínio RVT_thumb ressaltam 7 deleções com frequência entre os 9 e 34 % que só foram identificadas no WYO ADD e não na condição WYO NT. Foram identificadas duas regiões da TR que parecem possuir mais variações quando comparadas com o WYO NT, são elas os domínios RVT_thumb e o RVT_connect.

Analisando de uma forma global podemos constatar que dos 25 variantes WYO ADD, 10 correspondem a variantes comuns entre WYO NT e os restantes 15 são novos variantes. A figura 29 mostra uma análise pormenorizada dos variantes existentes em WYO ADD.

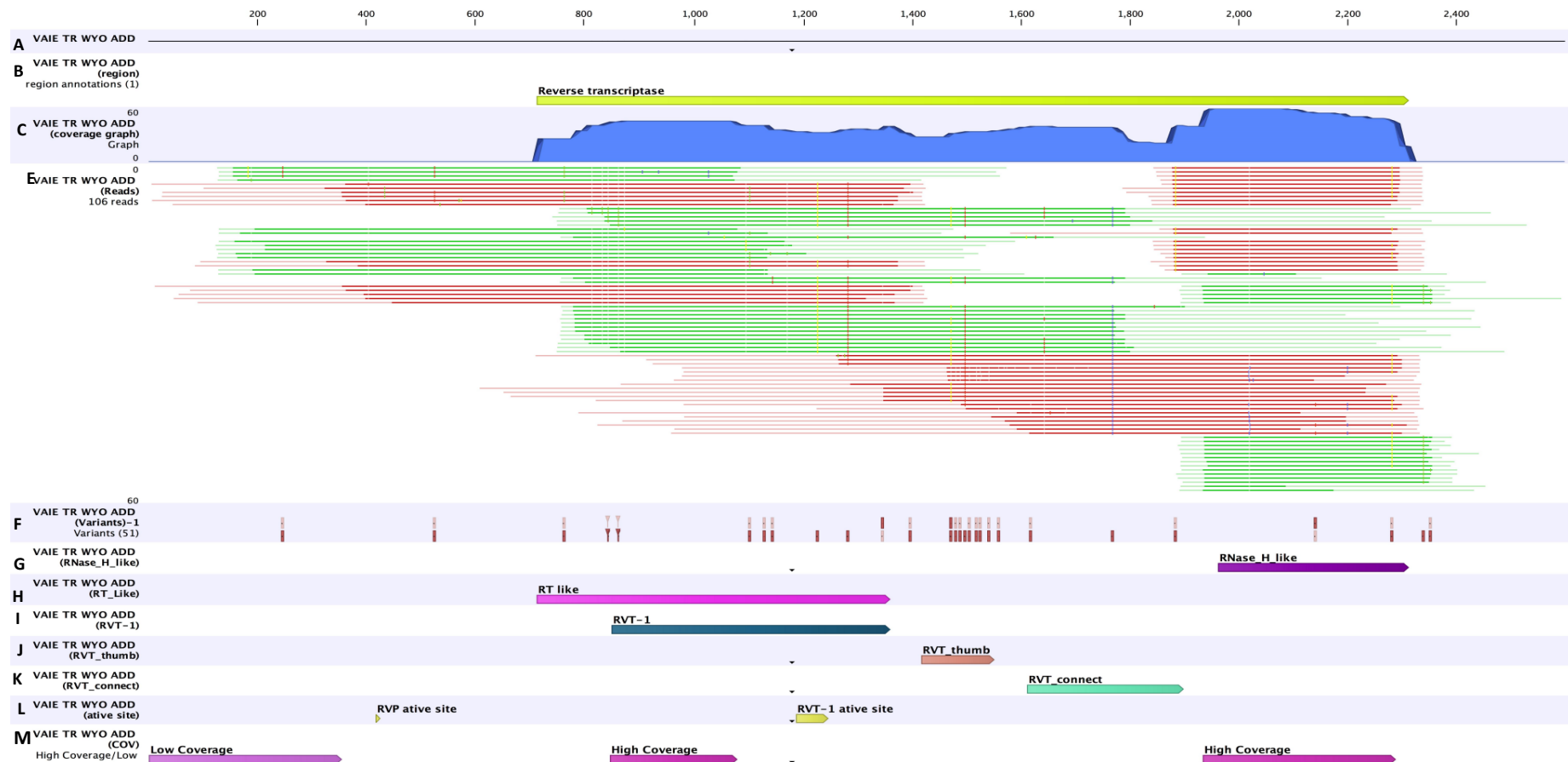


Figura 28- “Track list” do alinhamento das sequências WYO tratatdo com Adefovir dipivoxil (WYO ADD) com a sequência de referência. Sequência consensos VAIE_{WYO} ADD (A); Região TR (B); “Coverage” Cobertura do gene da TR (C) Identificação de regiões de elevada e baixa cobertura (M); Alinhamento/mapeamento das 106 sequências de VAIE_{WYO} ADD (E); 51Variantes da zona de seleção (F); Domínios da TR: RT_like (H), RVT-1 (I); RVT_Thumb (J), RVT_connect (K), RNase_H_like (G) e Locais ativos: RVP e RVT-1 (L).

Posição do Variante na Região	Tipo de variante	Nº	Base presente na sequência referência	Alelo	Nº de alelos	Cobertura do alelo	Frequência do alelo	Valor mínimo Forward/reverse	Qualidade média	Região da TR- Domínios	Alteração da região codificante da sequência de referência	Alteração de aminoácidos
764	VNS	1	C	T	6	21	28.57	0.50	50.83	RT_Like	c.636C>T *	
843	Inserção	1	-	T	4	43	9.30	0.00	42.75	RT_Like	c.714_715insT	p.Val240fs
861	Inserção	1	-	T	4	44	9.09	0.00	24.00	RT_Like e RVT-1	c.732_733insT	p.Ser245fs
1100	VNS	1	A	T	9	41	21.95	0.33	35.89	RT_Like e RVT-1	c.972A>T *	p.Lys324Asn
1127	Deleção	1	C	-	3	41	7.32	0.00	32.67	RT_Like e RVT-1	c.999delC	p.Pro334fs
1142	VNS	1	G	A	2	36	5.56	0.00	46.00	RT_Like e RVT-1	c.1014G>A *	
1224	VNS	1	A	G	33	33	100.00	0.39	51.42	RT_Like e RVT-1	c.1096A>G *	p.Met366Val
1280	VNS	1	G	A	36	36	100.00	0.44	50.08	RT_Like e RVT-1	c.1152G>A *	
1344	Deleção	1	T	-	4	35	11.43	0.00	13.00	RT_Like e RVT-1	c.1216delT	p.Trp406fs
1395	Deleção	1	T	-	2	32	6.25	0.00	22.00	Região Transcriptase reversa	c.1267delT	p.Leu423fs
1470	VNS	1	A	G	8	12	66.67	0.00	54.62	RVT_thumb	c.1342A>G *	p.Ile448Val
1470	Deleção	1	A	-	4	12	33.33	0.00	26.25	RVT_thumb	c.1342delA	p.Ile448fs
1479	Deleção	1	T	-	4	32	12.50	0.00	20.25	RVT_thumb	c.1351delT	p.Leu451fs
1487	Deleção	1	A	-	4	32	12.50	0.00	25.25	RVT_thumb	c.1359delA	p.Lys454fs
1496	VNS	1	T	A	33	33	100.00	0.39	47.64	RVT_thumb	c.1368T>A *	
1504	Deleção	1	C	-	3	33	9.09	0.00	18.67	RVT_thumb	c.1376delC	p.Thr459fs
1517	Deleção	1	T	-	4	32	12.50	0.00	18.25	RVT_thumb	c.1389delT	p.Leu464fs
1524	Deleção	1	T	-	3	32	9.38	0.00	21.67	RVT_thumb	c.1396delT	p.Leu466fs
1540	Deleção	1	T	-	4	32	12.50	0.00	30.00	RVT_thumb	c.1412delT	p.Trp472fs
1558	Deleção	1	A	-	2	35	5.71	0.00	21.00	Região Transcriptase reversa	c.1430delA	p.Glu479fs
1617	Deleção	1	A	-	3	40	7.50	0.00	12.00	RVT_connect	c.1489delA	p.Asn497fs
1767	VNS	1	T	C	39	39	100.00	0.49	46.51	RVT_connect	c.1639T>C *	
1883	VNS	1	T	G	20	41	48.78	0.00	43.30	RVT_connect	c.1755T>G *	
2140	VNS	1	C	A	3	53	5.66	0.00	52.00	RNase_H_like	c.2012C>A	p.Thr671Asn
2281	VNS	1	A	G	34	42	80.95	0.35	47.82	RNase_H_like	c.2153A>G *	p.Tyr718Cys

Figura 29- Análise dos variantes filtrados para a região TR do WYO ADD. Foram detetados 25 variantes, 11 dos quais são variantes nucleotídeos simples, com 12 deleções e 2 inserções. Dos 25 variantes, 10 variantes são comuns ao WYO N. Os variantes não comuns ao WYO NT encontram-se entre os domínios RVT_thumb e RVT_connect.

5.3.7. Alinhamento das sequências consenso de WYO NT com WYO ADD

Do mapeamento “*assembly*” das sequências obtidas WYO NT e WYO ADD com a sequência de referência foi possível obter uma sequência consenso para ambas as condições. Com o objetivo de comparar as sequências obtidas com/sem tratamento com antirretroviral realizou-se o alinhamento das sequências consenso. A figura 30 mostra que existe 18 conflitos, 11 na sequência consensos WYO ADD e 7 conflitos na sequência consensos WYO NT. Dos 18 conflitos, 10 são conflitos comuns entre as duas condições, como por exemplo o conflito no domínio RT_Like da posição 388 (WYO ADD) e 387 (WYO NT) da TR, de um nucleotídeo de ambiguidade “W” (Anexo VII).

Para além dos conflitos partilhados existem 5 conflitos adicionais na sequência consenso do VAIE_{WYO} ADD, um destes localiza-se na posição 632 do domínio RT_Like e os restantes distribuem-se entre as posições 767 e a 828, inclusive, do domínio RVT_thumb. Já para a sequência consenso do VAIE_{WYO} NT, existem 2 conflitos adicionais, estando um deles localizado no domínio RT_like (posição 567) e um outro entre os domínios RVT_connect e RNase_H_like.

Todos os conflitos foram analisados através de parâmetros de análise, como a cobertura, frequência, domínio e posição do conflito em relação à região, estes podem ser observados na figura 31.



Figura 30- Alinhamento das sequências consensos WYO NT com WYO ADD com anotação dos conflitos observados nas duas sequências.

SEQUÊNCIA	TIPO	REGIÃO TR	REGIÃO POL	PARÂMETROS DE ANÁLISE	DOMÍNIO
TR CONSENSUS WYO ADD	Conflict	51	636	/Conflict resolution =Ambiguity nucleotides called 'Y'; /Coverage=26; /C frequency (count)=0.77 (20); /T frequency (count)=0.23 (6); /Reference position=764	RT_like
TR CONSENSUS WYO ADD	Insertion	130	715	/Length=1; /Reference position=842^843	RT_like
TR CONSENSUS WYO ADD	Conflict	388	973	/Conflict resolution =Ambiguity nucleotides called 'W'; /Coverage=41; /A frequency (count)=0.78 (32); /T frequency (count)=0.22 (9); /Reference position=1100	RT_like
TR CONSENSUS WYO ADD	Conflict	632	1217	/Conflict resolution =Ambiguity nucleotides called 'T'; /Coverage=36; /gap frequency (count)=0.11 (4); /T frequency (count)=0.89 (32); /Reference position=1344	RT_like
TR CONSENSUS WYO ADD	Conflict	758	1343	/Conflict resolution =Ambiguity nucleotides called 'G'; /Coverage=32; /gap frequency (count)=0.13 (4); /G frequency (count)=0.72 (23); /Reference position=1470	RVT_thumb
TR CONSENSUS WYO ADD	Conflict	767	1352	/Conflict resolution =Ambiguity nucleotides called 'T'; /Coverage=32; /gap frequency (count)=0.13 (4); /T frequency (count)=0.88 (28); /Reference position=1479	RVT_thumb
TR CONSENSUS WYO ADD	Conflict	775	1360	/Conflict resolution =Ambiguity nucleotides called 'A'; /Coverage=32; /gap frequency (count)=0.13 (4); /A frequency (count)=0.88 (28); /Reference position=1487	RVT_thumb
TR CONSENSUS WYO ADD	Conflict	805	1390	/Conflict resolution =Ambiguity nucleotides called 'T'; /Coverage=34; /gap frequency (count)=0.12 (4); /T frequency (count)=0.88 (30); /Reference position=1517	RVT_thumb
TR CONSENSUS WYO ADD	Conflict	828	1413	/Conflict resolution =Ambiguity nucleotides called 'T'; /Coverage=34; /gap frequency (count)=0.12 (4); /T frequency (count)=0.88 (30); /Reference position=1540	RVT_thumb
TR CONSENSUS WYO ADD	Conflict	1171	1756	/Conflict resolution =Ambiguity nucleotides called 'K'; /Coverage=41; /G frequency (count)=0.49 (20); /T frequency (count)=0.51 (21); /Reference position=1883	RVT_connect
TR CONSENSUS WYO ADD	Conflict	1569	2154	/Conflict resolution =Ambiguity nucleotides called 'R'; /Coverage=46; /A frequency (count)=0.22 (10); /G frequency (count)=0.78 (36); /Reference position=2281	RNase_H_like
TR CONSENSUS WYO NT	Conflict	51	636	/Conflict resolution =Ambiguity nucleotides called 'Y'; /Coverage=22; /C frequency (count)=0.36 (8); /T frequency (count)=0.64 (14); /Reference position=837	RT_like
TR CONSENSUS WYO NT	Conflict	387	972	/Conflict resolution =Ambiguity nucleotides called 'W'; /Coverage=42; /A frequency (count)=0.64 (27); /T frequency (count)=0.36 (15); /Reference position=1173	RT_like
TR CONSENSUS WYO NT	Conflict	567	1152	/Conflict resolution =Ambiguity nucleotides called 'R'; /Coverage=56; /A frequency (count)=0.61 (34); /G frequency (count)=0.39 (22); /Reference position=1353	RT_like
TR CONSENSUS WYO NT	Conflict	757	1342	/Conflict resolution =Ambiguity nucleotides called 'R'; /Coverage=54; /A frequency (count)=0.39 (21); /G frequency (count)=0.59 (32); /Reference position=1543	RVT_thumb
TR CONSENSUS WYO NT	Conflict	1170	1755	/Conflict resolution =Ambiguity nucleotides called 'K'; /Coverage=53; /G frequency (count)=0.30 (16); /T frequency (count)=0.70 (37); /Reference position=1956	RVT_connect
TR CONSENSUS WYO NT	Conflict	1220	1805	/Conflict resolution =Ambiguity nucleotides called 'R'; /Coverage=54; /A frequency (count)=0.19 (10); /G frequency (count)=0.81 (44); /Reference position=2006	
TR CONSENSUS WYO NT	Conflict	1568	2153	/Conflict resolution =Ambiguity nucleotides called 'R'; /Coverage=42; /A frequency (count)=0.14 (6); /G frequency (count)=0.86 (36); /Reference position=2354	RNase_H_like

Figura 31- Conflitos existentes nas sequências consensos WYO NT e para WYO ADD.

5.4. Variabilidade genética de populações de VAIE

5.4.1. Alinhamento de sequências VAIE com origem geográfica diferente e diferentes isolados primários e de laboratório

Neste estudo foram analisadas 47 sequências genômicas de VAIE com um genoma superior a 7 kb. Utilizamos a estirpe NC-001450 como sequência de referência. Na figura 32 podemos visualizar uma tabela com a informação relevante das sequências analisadas, tais como a referência da Genbank ou NCBI, tamanho, ácidos nucleicos - ARN ou ADN – a partir dos quais foram obtidas as sequências, tipo de amostra, a sua origem geográfica, nome da estirpe, publicação e autor.

	NºREFERÊNCIA GENEBANK	TAMANHO	ESTRUTURA	AMOSTRA	ORIGEM	NOME	PUBLICAÇÃO	AUTOR
1	NC_001450	8359 bp	ARN linear	ARN genômico	USA	NCBI Sequência de Referência	11-03-2010	Petropoulos, CJ
2	AB008196	7896 bp	ARN linear	ARN genômico	Japão	V70	01-09-2000	Zheng,YH (2000)
3	AB008197	7913 bp	ARN linear	ARN genômico	Japão	V26	01-09-2000	Zheng,YH (2000)
4	AF016316	8282 bp	ADN linear	ARN genômico	USA Vuk	Vuk	24-02-1998	Cook, FR (1998)
5	AF028231	8216 bp	ADN linear	ADN genômico proviral	USA (Arlington)	p19/wenv16	23-06-1998	Payne, SL (1998)
6	AF028232	8229 bp	ADN linear	ADN genômico proviral	USA (Arlington)	p19/wenv17	23-06-1998	Payne, SL (1998)
7	AF247394	8249 bp	mARN linear	mARN proviral	USA (Washington)	WSU5	17-11-2000	McGuire, TC (2000)
8	AF327877	8235 bp	ADN linear	ADN genômico proviral	China (Liaoning)	Liaoning	22-12-2006	Tu, YB (2007)
9	AF327878	8266 bp	ADN linear	ADN genômico	China	vaccine	22-12-2006	Tu, YB (2007)
10	AR790275	8258bp	ADN linear	ADN genômico	China		17-01-2006	Shao,Y(2006)
11	M87581.1/EIACGIP	8196bp	ssARN linear	ARN genômico	USA (Maryland)		11-06-1993	Perry,ST(1992)
12	M16575.1/EIACGIP	8407bp	ssARN linear	ARN genômico	USA (Maryland)	Clone 1369 e 409-2	26-09-1985	Chiu,IM (1985)
13	GU385353	8255 bp	ADN linear	ADN genômico proviral	China	FDDV-5	08-02-2011	Wang, X (2011)
14	GU385354	8255 bp	ADN linear	ADN genômico proviral	China	FDDV-6	08-02-2011	Wang, X (2011)
15	GU385355	8258 bp	ADN linear	ADN genômico proviral	China	FDDV-2	08-02-2011	Wang, X (2011)
16	GU385356	7549 bp	ADN linear	ADN genômico proviral	China	FDDV-15-4	08-02-2011	Wang, X (2011)
17	GU385357	8174 bp	ADN linear	ADN genômico proviral	China	FDDV-7	08-02-2011	Wang, X (2011)
18	GU385358	8254 bp	ADN linear	ADN genômico proviral	China	FDDV-8	08-02-2011	Wang, X (2011)
19	GU385359	8255 bp	ADN linear	ADN genômico proviral	China	FDDV-9	08-02-2011	Wang, X (2011)
20	GU385360	8254 bp	ADN linear	ADN genômico proviral	China	FDDV-10	08-02-2011	Wang, X (2011)
21	GU385361	8255 bp	ADN linear	ADN genômico proviral	China	FDDV3-8TM	08-02-2011	Wang, X (2011)
22	GU385362	8237 bp	ADN linear	ADN genômico proviral	China	LN-1	08-02-2011	Wang, X (2011)
23	GU385363	8237 bp	ADN linear	ADN genômico proviral	China	LN-3	08-02-2011	Wang, X (2011)
24	GU385364	8237 bp	ADN linear	ADN genômico proviral	China	LN-4	08-02-2011	Wang, X (2011)
25	GU385365	8237 bp	ADN linear	ADN genômico proviral	China	LN-5	08-02-2011	Wang, X (2011)
26	HM141909	8233 bp	ADN linear	ADN genômico proviral	China	DV3-5	11-04-2011	Wang, X (2011)
27	HM141910	8233 bp	ADN linear	ADN genômico proviral	China	DV10-3	11-04-2011	Wang, X (2011)
28	HM141911	8239 bp	ADN linear	ADN genômico proviral	China	DV35-20	11-04-2011	Wang, X (2011)
29	HM141912	8236 bp	ADN linear	ADN genômico proviral	China	DV117	11-04-2011	Wang, X (2011)
30	HM141913	8277 bp	ADN linear	ADN genômico proviral	China	DLV3-A	11-04-2011	Wang, X (2011)
31	HM141914	8249 bp	ADN linear	ADN genômico proviral	China	DLV7-18	11-04-2011	Wang, X (2011)
32	HM141915	8256 bp	ADN linear	ADN genômico proviral	China	DLV8-2	11-04-2011	Wang, X (2011)
33	HM141916	8260 bp	ADN linear	ADN genômico proviral	China	DLV10-19	11-04-2011	Wang, X (2011)
34	HM141917	8262 bp	ADN linear	ADN genômico proviral	China	DLV19-9	11-04-2011	Wang, X (2011)
35	HM141918	8224 bp	ADN linear	ADN genômico proviral	China	DLV15-16	11-04-2011	Wang, X (2011)
36	HM141919	8233 bp	ADN linear	ADN genômico proviral	China	DV31-2	11-04-2011	Wang, X (2011)
37	HM141920	8240 bp	ADN linear	ADN genômico proviral	China	DLV2-6	11-04-2011	Wang, X (2011)
38	HM141921	8264 bp	ADN linear	ADN genômico proviral	China	DLV5-10	11-04-2011	Wang, X (2011)
39	HM141922	8240 bp	ADN linear	ADN genômico proviral	China	DLV9-7	11-04-2011	Wang, X (2011)
40	HM141923	8227 bp	ADN linear	ADN genômico proviral	China	DLV18-8	11-04-2011	Wang, X (2011)
41	JX003263	8208 bp	ADN linear	ADN genômico proviral	Japão (Misaki horse)	Miyazaki2011-A	04-11-2012	Dong, J (2012)
42	JX480631	8254 bp	ADN linear	ADN genômico proviral	Irlanda	F2	19-11-2012	Quinlivan, M (2012)
43	JX480632	8275 bp	ADN linear	ADN genômico proviral	Irlanda	F3	19-11-2012	Quinlivan, M (2012)
44	JX480633	8272 bp	ADN linear	ADN genômico proviral	Irlanda	F4	19-11-2012	Quinlivan, M (2012)
45	JX480634	8266 bp	ADN linear	ADN genômico proviral	Irlanda	H3	19-11-2012	Quinlivan, M (2012)
46	KM247554	7841bp	ADN linear	ADN genômico proviral	Itália		02-02-2016	Capomaccio,S (2014)
47	KM247555	7841bp	ADN linear	ADN genômico proviral	Itália		02-02-2016	Capomaccio,S (2014)

Figura 32- Sequências VAIE selecionadas na base de dados pública – NCBI-Genbank.

O alinhamento das sequências acima descritas foi efetuado pelas ferramentas de alinhamento do CLC Genomics Workbench, descritas no material e métodos, e os resultados são apresentados na figura 33. Este alinhamento esteve na base da árvore filogenética apresentada na figura 35 e pode ser visualizado em detalhe no anexo IX. Devido ao elevado tamanho do genoma do VAIE e elevado número de variantes encontrados a análise do alinhamento torna-se complexa.

Para facilitar a análise e visualização destes variantes genéticos efetuamos de seguida um mapeamento das 46 sequências à sequência de referência, criando de seguida *tracks* com as anotações desejadas e gerando uma ‘*track list*’ apresentada na figura 34 de modo a poder visualizar as regiões, genes e variantes genéticos em estudo.

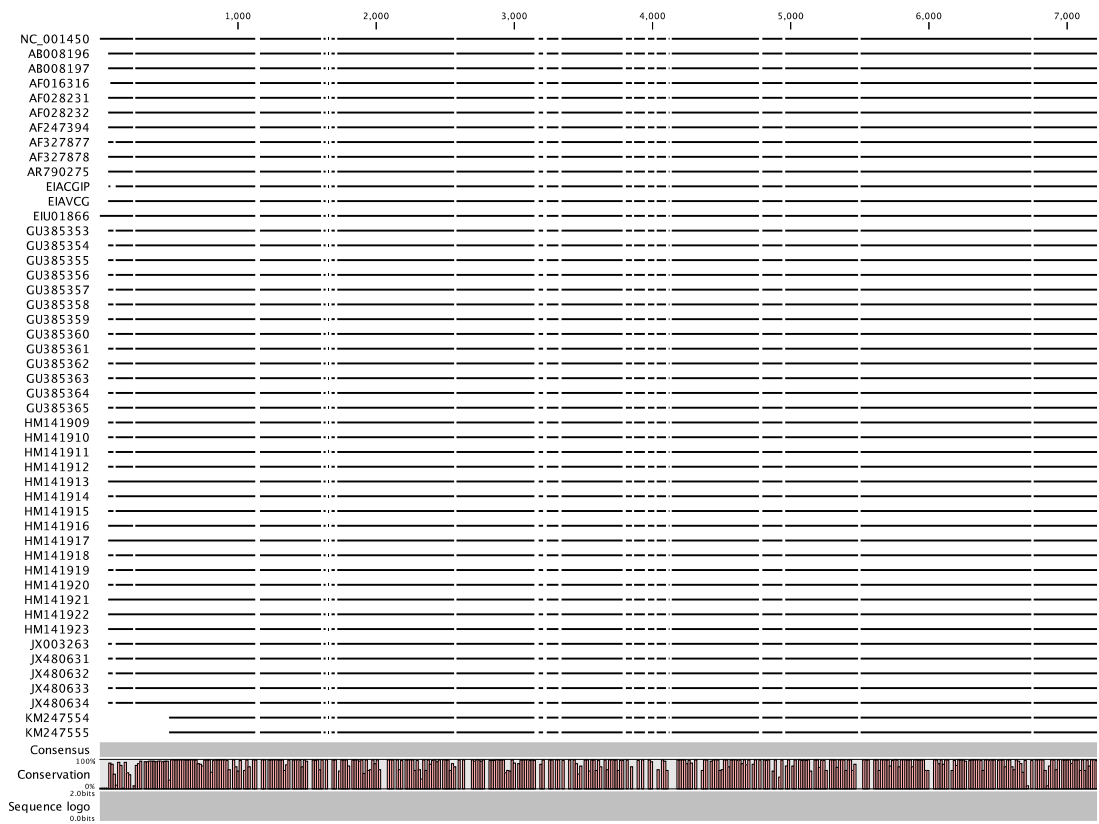


Figura 33- Alinhamento das sequências de VAIE. O alinhamento das sequências de VAIE com a sequência NC_001450 de referência permitiu identificar quais as zonas consenso e os variantes existentes.

5.4.2. Mapeamento e sequência de consenso do VAIE

A “track list” da Figura 34 permitiu uma melhor visualização do mapeamento de todas as sequências e dos variantes reportados para o VAIE no genbank. Permitiu também observar em paralelo as regiões do genoma, o enquadramento dos fragmentos em estudo e análise de variantes genéticos para regiões específicas.

Na análise de variantes genéticos do VAIE total identificamos 4561 variantes, dos quais 706 são localizados na TR.

Quando analisada a região alvo da TR observamos uma maior variabilidade, na região 3’ do domínio RT_Like, no domínio RVT_thumb e na região 5’ do domínio RNase_H_like. O domínio RVT_thumb quando comparado com os outros domínios da TR é aquele que possui maior variabilidade.

Da análise global do mapeamento e *track list* verificamos que o gene *pol* é dos genes mais conservados do genoma de VAIE. No gene *pol* as regiões onde se acumularam mais variantes são a região 5’ da *pol*, correspondendo à região de *frameshift* gag-pol e protease. Identificamos também que as regiões que codificam para as proteínas acessórias *tat* e *S2* e envelope (Env) são as regiões do VAIE que apresentam uma maior variabilidade genética. Além destas regiões também o promotor 3’ LTR apresentou uma grande variabilidade genética.

Como resultado deste mapeamento foi possível obter uma sequência de consenso para o VAIE.



Figura 34- “Track list” da análise comparativa do alinhamento das sequências de VAIE com a sequência de referência.

5.5. Árvore Filogenética de VAIE

A figura 35 mostra uma árvore filogenética para o VAIE. Nesta árvore foi possível identificar 4 grandes “cluster” e respectivas distâncias filogenéticas. Esta árvore filogenética foi suportada por um valor de “bootstrap” de 100.

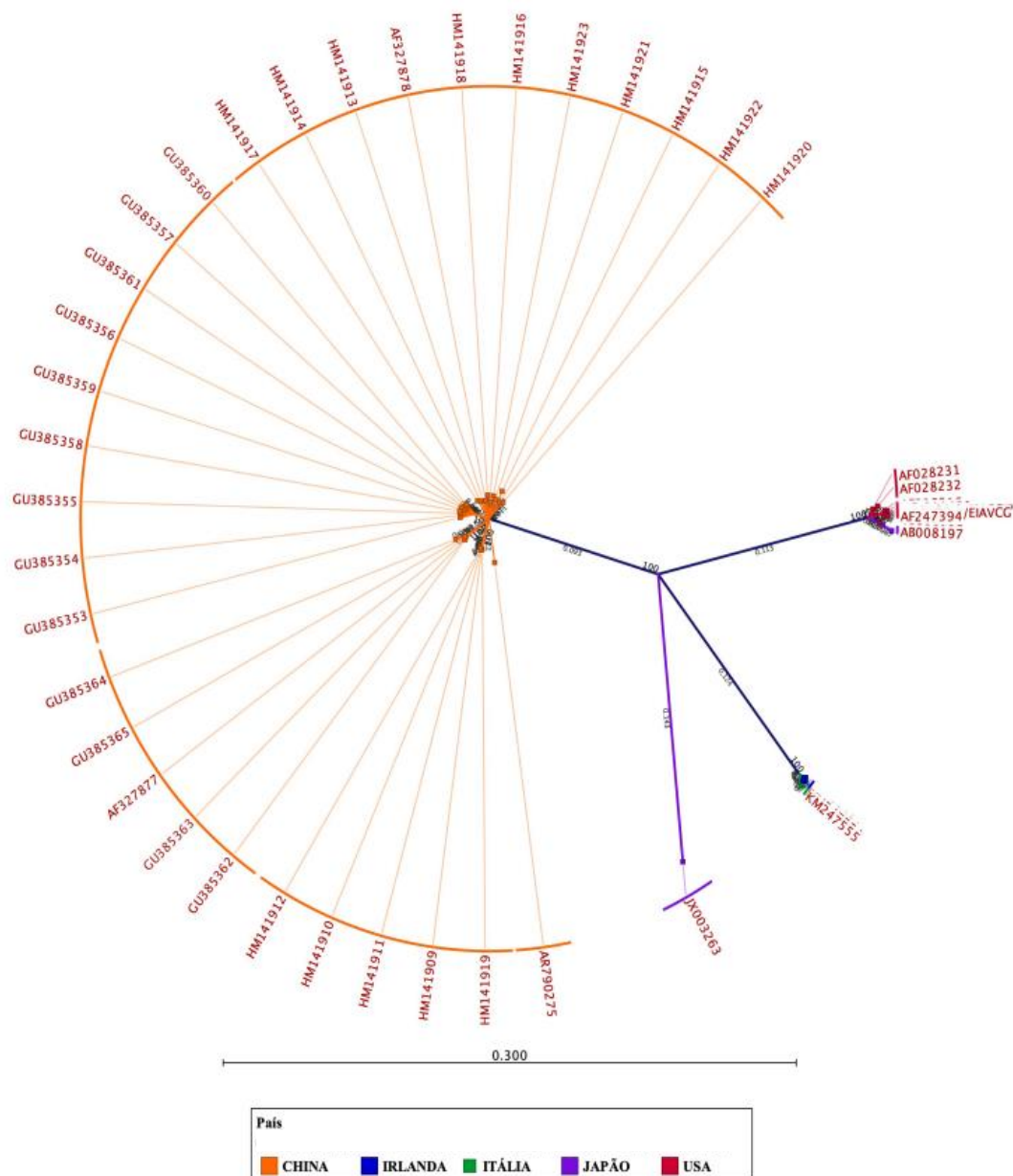


Figura 35- Filograma radial de VAIE com distribuição geográfica diferente.

Os “cluster” encontrados encontraram-se fortemente associados à distribuição geográfica de origem do VAIE. Assim obtivemos o “cluster” que agrupa todas as sequências provenientes da China; o “cluster” do Japão bem destacado e ocupado apenas por uma sequência; o “cluster” da Europa que agrupa todas as sequências provenientes

da Irlanda e Itália; e o “cluster” do USA-Japão. O “cluster” da China apresenta uma distância da raiz de 0.093, o dos USA-Japão encontra-se a 0.113 da raiz, o das Europeias com 0.124 e, por último com uma distância de 0.143 o “cluster” do Japão.

O único “cluster” que contém sequências de VAIE provenientes de diferentes regiões geográficas é o “cluster” USA- Japão. A figura 36 mostra com detalhe este “cluster” que agrupa sequências oriundas dos USA e do Japão. Com a ampliação deste ramo verificamos que duas estirpes japonesas, correspondentes as estirpes V26 e V70, estão localizadas no mesmo ramo que as americanas. Ao passo que uma terceira estirpe proveniente do Japão, a JX003263, se encontra muito distante estabelecendo um novo *cluster* isolado.

Neste “cluster” dos USA-Japão há duas estirpes norte americanas que se destacam das restantes, as estirpes com a referência AF028231 e AF028232, com uma distância de 0.05 e 0.08, respetivamente, em relação ao nó deste “cluster”. Estas duas estirpes são estirpes patogénicas obtidas de um isolado primário de Wyoming não adaptado *in vitro*. As restantes estirpes americanas encontram-se mais próximas a uma distância de 0.006 do nó e com distância do sub-nó na ordem dos 0.004.

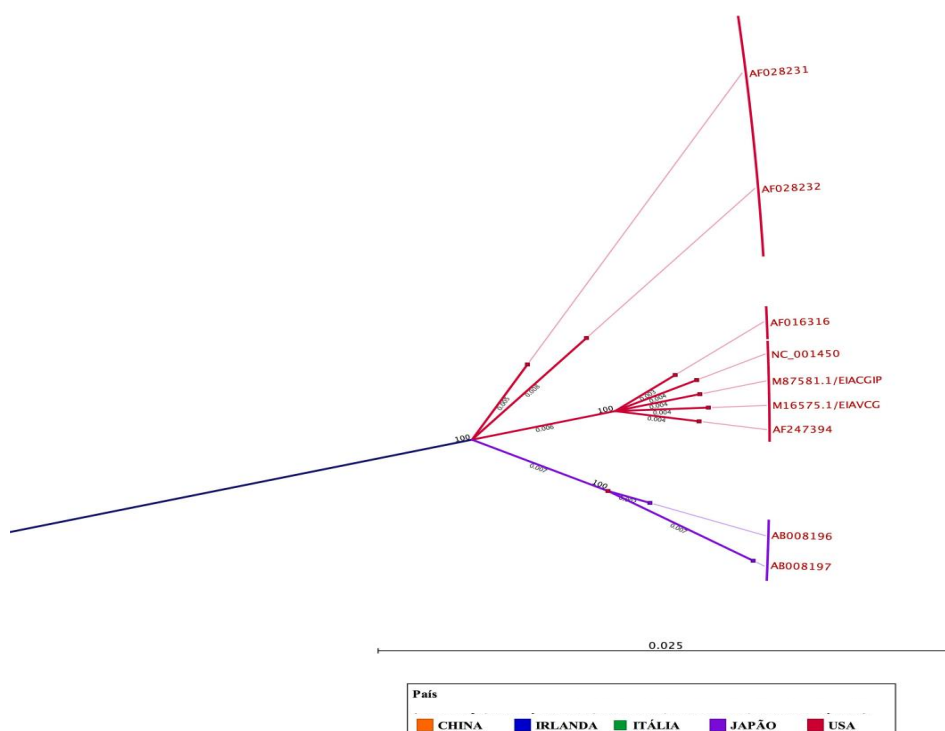


Figura 36- “Cluster” ampliado com a representação das estirpes do Japão e dos USA.

A figura 37, mostra a ampliação do ramo Europeu onde é possível observar o “*clustering*” das estirpes europeias provenientes da Irlanda e Itália. As estirpes Italianas encontram-se com uma distância de 0.006 em relação às Irlandesas 0.004.

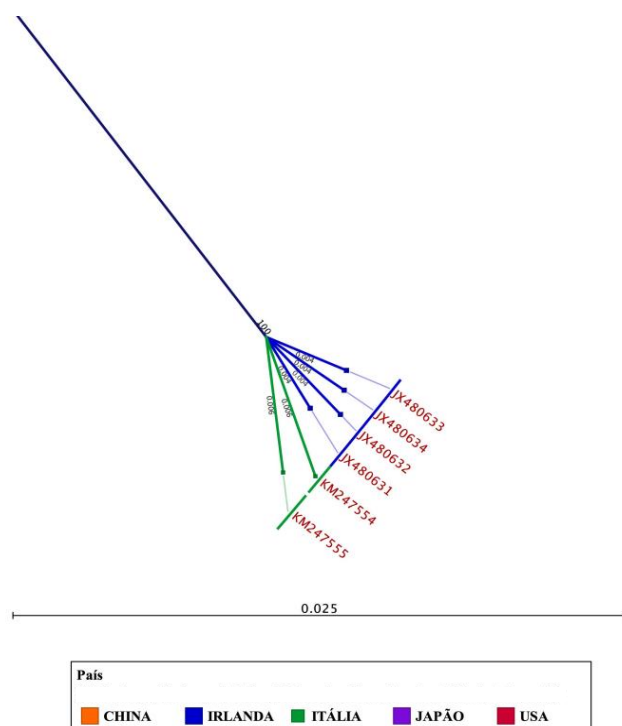


Figura 37- “Cluster” ampliado com a representação das estirpes da Itália e da Irlanda.

6. DISCUSSÃO

6.1. Ensaios Antivirais

Neste estudo apresentamos pela primeira vez o efeito de vários antirretrovirais na replicação do VAIE e demonstramos que o Adefovir dipivoxil (ADD), um NITR, é o candidato mais promissor para terapia antiviral de VAIE. O ADD além de possuir uma IC_{50} na ordem de concentrações nanomolares possui também um excelente índice de seletividade.

Os NITR Tenofovir e Zidovudina em concentrações de 10 μ M também demonstraram ter um efeito significativo na inibição da replicação VAIE. Além dos NITR também os antivirais inibidores das proteases (IPs) Darunavir e Indinavir, em concentrações de 10 μ M, demonstraram ter um efeito significativo na inibição da replicação do VAIE. No entanto, outros antivirais, como a Ciclosporina e Nevirapina, não apresentaram qualquer efeito na inibição da replicação do VAIE.

O valor da IC_{50} do ADD em dose única obtido nas células ED aos 7 dias p.i foi de 3.383nM, ao passo que aos 12 dias p.i foi 20.01 nM, aos 20 dias p.i foi de 13.29 nM, e de 13.34 nM ao fim de 33 dias de infecção, sem reposição do antirretroviral.

A IC_{50} obtida para o dia 12 foi superior à obtida para o dia 7 p.i. Esta subida pode ser explicada pelo facto de a replicação viral máxima ocorrer entre os 10 e os 15 dias p.i como se pode verificar na cinética de replicação da figura 18.

Os ensaios antivirais efetuados ao longo do tempo demonstraram que o VAIE não tem capacidade para retomar a sua replicação depois de tratado com ADD. Verificamos que o valor de IC_{50} diminuiu ou se manteve constante ao longo dos 33 dias p.i sem reposição do antirretroviral. Este fato pode sugerir um potencial modo de ação irreversível para o ADD e/ou uma grande estabilidade em cultura celular.

Em estudos *in vivo*, nomeadamente em humanos, o tempo de semivida do ADD é curto, sendo este administrado em doses diárias de modo a superar a diminuição da atividade deste antiviral (Kahn *et al.*, 1999; Qaqish *et al.*, 2003).

In vivo, o VAIE replica-se preferencialmente em macrófagos, sendo estas células de um modo geral importantes reservatórios celulares dos lentivírus (Clements *et al.*, 1996). No entanto, em cultura de tecidos o VAIE mostra capacidade para se adaptar e infetar outros tipos de celulares, como células endoteliais e fibroblastos (Oaks *et al.*, 1998).

Desta forma realizamos os ensaios CC₅₀ e IC₅₀ do ADD em células fibroblásticas e macrofágicas - EML. No entanto, não foi possível apresentar resultados dos ensaios de IC₅₀ do ADD em células EML, uma vez que o VAIE_{WYO} depois de adaptado às células ED perdeu a capacidade para replicar em linha de macrófagos -EML.

O valor da CC₅₀ do ADD em células ED foi de 141.8 µM e foi semelhante ao encontrado para a CC₅₀ nas células EML, de 207.10 µM. Os valores de CC₅₀ encontrados nas células equinas foram mais altos do que os encontrados para as células do sangue humanas, o que sugere uma menor toxicidade desta droga nos cavalos.

A CC₅₀ do Adefovir dipivoxil em células HB611 foi de 107 µM.

A razão entre a citotoxicidade e a eficácia do antiviral na inibição da replicação viral é definida como o índice de seletividade (IS) ou índice terapêutico. É desejável que um antirretroviral tenha um alto índice de seletividade, ao possuir uma atividade antiviral máxima com uma toxicidade celular mínima.

Neste estudo verificamos que o ADD apresenta um excelente índice de seletividade de 41,915.5.

Noble e Goa, 1999 em estudos com Adefovir (AD) na inibição da replicação VIH-1 em células T demonstrou valores de índice seletividade *in vitro* que variam entre 2 a 200.

Mais ainda, Srinivas *et al.*, 1993 determinou que a IC₅₀ do ADD foi de 2 µM para o VIH-1 em células MT-2. A IC₅₀ encontrada para o VAIE foi drasticamente inferior à reportada para VIH-1.

6.2. Análise de resistências genéticas de VAIE ao ADD

A TR é uma enzima heterodimérica, com cerca de 987 resíduos de aminoácidos. Neste estudo analisamos os variantes genéticos oriundos de vírus submetidos ao ADD em concentrações próximas da IC₅₀.

Neste estudo foram detetados um maior número de variantes para o WYO ADD do que para o WYO NT, sendo muitos dos variantes encontrados para o WYO ADD deleções. No entanto após uma análise detalhada das sequencias verificamos que estas deleções derivaram de erros de sequenciação. Estes erros tiveram origem no fato de estas sequencias possuírem elevados valores de fluorescência que determinaram uma maior largura do pico de sequenciação e por conseguinte a introdução de uma posição adicional

no genoma da TR. Por exemplo, o falso variante nucleotídeo simples G>A da posição 1014 da região RT_Like.

Da comparação de variantes genéticas entre WYO NT e WYO ADD verificamos que nove variantes são comuns (Figura 38). Destes 4 são VNS não sinónimos (missense) que provocam alterações nos aminoácidos. Um destes VNS situa-se no domínio RT_Like, na posição 972, com uma substituição A>T, que se traduz uma alteração da enzima na posição 324 com substituição de uma lisina (Lis - K) (codão AAA) por uma Asparagina (Asn - N) (codão AAU). A Lisina possui grupo R com carga positiva e a Asparagina tem carga neutra, ambos pertencem aos aminoácidos polares hidrofílicos.

Outro VNS não sinónimo ocorre no domínio RT_Like e local ativo RVT-1, na posição 1096, com a substituição de A>G, ocorrendo uma alteração na enzima na posição 366 de uma Metionina (Met- M) codão de iniciação (AUG) por uma Valina (Val -V) (codão GUG). Os dois aminoácidos são compostos por um grupo R alifático, pertencendo ao grupo dos aminoácidos apolares hidrofóbicos. No domínio RVT_thumb, na posição 1342, ocorre também um variante nucleotídeo simples de troca de A>G que se traduz na alteração da enzima na posição 448 com a substituição de uma Isoleucina (Ile - I) (codão AUC) por uma Valina (Val- V) (codão GUC), ambos pertencendo ao mesmo grupo dos aminoácidos apolares hidrofóbicos com grupo R alifáticos. Por último, no domínio RNase_H_Like na posição 2153 ocorreu um VNS A>G, com alteração da enzima na posição 718 de uma Tirosina (Tir- Y) (codão UAU) para uma Cisteína (Cis- C) (codão UGU). A Tirosina pertence ao grupo dos aminoácidos apolar hidrofóbico com grupo R aromático e a Cisteína ao grupo dos polares hidrofílicos com grupo R sem carga. Este variante é o único que há alteração de um aminoácido apolar para um polar podendo provocar alterações estruturais no “*folding*” da proteína.

Dos variantes não comuns detetados nas sequências de WYO NT, só quatro demonstraram serem de fato reais. Um destes variantes é uma deleção de uma adenina encontrada no domínio RVT_connect na posição 1646 que provoca alteração na TR a partir da posição 549 com uma Glutamina (Gln- Q). Também nesta região existe um VNS com substituição A>G na posição 1743 em relação à referência, mas que não provoca qualquer alteração na codificação de aminoácidos. Na região da TR, na posição 1805 encontra-se um VNS com substituição de G>A, em que provoca alteração na enzima na posição 602 de uma Arginina (Arg- R) (codão AGA) por uma Lisina (Lis-K) (codão AAA). Ambos os aminoácidos pertencem ao grupo dos aminoácidos polares hidrofílicos com grupo R com carga positiva. O último variante foi detetado no domínio

RNase_H_like, com uma inserção de uma adenina (A) entre posição 2142 e 2143 em relação à referência. Esta inserção provoca a mudança de “*frame*” a partir da posição 716 da enzima e duma Glicina.

Numa análise pormenorizada dos variantes não comuns nas sequencias WYO ADD, verificou-se que dos 15 variantes não comuns apenas 2 deles demonstraram que ser reais. Todos os outros se deveram a erros de sequenciação pelas mesmas razões apontadas para o WYO NT.

Os dois variantes não comuns do WYO ADD são duas deleções encontradas no domínio do RVT_thumb que provocam mudanças de “*frame*” e alterações profundas nos aminoácidos da TR. Uma deleção de uma Adenina (A) na posição 1342 com alteração da enzima na posição 448 no aminoácido Isoleucina (Ile - I) e uma deleção de uma Timina (T) na posição 1412 em relação à referencia, com alteração da enzima TR na posição 472 do aminoácido Triptofano (Trp - W).

De modo a estudar o impacto destes VNS na estrutura e função da TR serão necessários estudos adicionais e estruturais da TR e/ou predição de alterações estruturais por métodos bioinformáticos, bem como estudos funcionais de atividade da TR destes variantes.

Origem do variante	Tipo de variante	Base presente na sequência referência	Alelo	Frequência do alelo NT	Frequência do alelo ADD	Região da TR- Domínios	Alteração da região codificante da sequência de referência	Alteração de aminoácidos
NT/ADD	VNS	C	T	60.00	28.57	RT like	c.636C>T *	
NT/ADD	VNS	A	T	35.71	21.95	RT_Like e RVT-1	c.972A>T *	p.Lys324Asn
NT/ADD	VNS	A	G	90.24	100.00	RT_Like e local ativo RVT-1	c.1096A>G *	p.Met366Val
NT/ADD	VNS	G	A	60.71	100.00	RT_Like e local ativo RVT-1	c.1152G>A *	
NT	VNS	T	C	10.00	-	RT_Like e local ativo RVT-1	c.1216T>C	p.Trp406Arg
ADD	Deleção	A	-	-	33.33	RVT_thumb	c.1342delA	p.Ile448fs
ADD	Deleção	T	-	-	12.50	RVT_thumb	c.1412delT	p.Trp472fs
NT/ADD	VNS	A	G	65.31	66.67	RVT_thumb	c.1342A>G *	p.Ile448Val
NT/ADD	VNS	T	A	100.00	100.00	RVT_thumb	c.1368T>A *	
NT/ADD	VNS	T	C	100.00	100.00	RVT_connect	c.1639T>C *	
NT	Deleção	A	-	4.44	-	RVT_connect	c.1646delA	p.Gln549fs
NT	VNS	A	G	5.13	-	RVT_connect	c.1743A>G	
NT/ADD	VNS	T	G	30.19	48.78	RVT_connect	c.1755T>G *	
NT	VNS	G	A	22.73	-	Região Transcriptase reversa	c.1805G>A	p.Arg602Lys
NT	Inserção	-	A	8.89	-	RNase_H_like	c.2142_2143insA	p.Gly716fs
NT/ADD	VNS	A	G	92.31	80.95	RNase_H_like	c.2153A>G *	p.Tyr718Cys

Figura 38- Variantes genéticos comuns e não comuns entre WYO NT e WYO ADD.

O alinhamento das sequências consenso WYO NT e WYO ADD foram também analisadas de forma mais pormenorizada, uma vez que se detetaram erros de sequenciação e o software CLC Genomics Workbench não permite a remoção destes erros pontuais de sequenciação. Através desta análise, verificamos que dos 14 conflitos encontrados nas sequências consenso só 8 é que são reais. Dos 8 variantes encontrados 6 são comuns entre WYO NT e WYO ADD e 2 não são comuns.

Dos 6 conflitos comuns, 3 encontram-se no domínio RT_like na posição 51 da TR com conflito Y (C>T), na posição 388 com conflito Y (A>T) e na posição 567 com conflito R (A>G); 1 encontra-se no domínio RVT_thumb na posição 758 um conflito R (A>G), os restantes 2 situam-se, na posição 51 do domínio RVT_connect da TR com conflito K (T>G) e o outro na posição 1568 do domínio da RNase_H com conflito R (A>G).

Dos 2 conflitos não comuns um foi encontrado na sequência consenso WYO NT e o outro na sequência consenso do WYO ADD. Na sequência consenso WYO NT o conflito R (G>A) encontra-se na posição 1220 na região da TR entre RVT_connect e RNase_H. O conflito não comum encontrado no WYO ADD foi uma deleção de uma Timina na posição 827 da TR no domínio RVT_thumb.

Deste estudo chegamos à conclusão que os conflitos identificados na condição VAIE WYO ADD não demonstraram qualquer resistência associada a estes variantes. Uma vez que nos ensaios IC₅₀ ao longo do tempo foi encontrada uma tendência a diminuição da IC₅₀ não se tendo verificado um aumento da replicação viral associada a estes variantes. Pelo contrário ao aqui exposto, outros estudos demonstraram através da análise fenotípica *in vitro*, de mutações na polimerase do HBV foi associada a uma redução significativa na suscetibilidade ao ADD e verificando-se resistência a este antiviral (Angus *et al.*, 2003; Qaqish *et al.*, 2003).

6.3. Análise genética e filogenética do VAIE

O genoma do VAIE apresentou uma grande variabilidade genética, sobretudo a região 3' do seu genoma. A análise filogenética dos isolados do VAIE permite-nos identificar “clusters” bem definidos.

Da análise da árvore filogenética do VAIE confirmamos a existência de 4 “clusters” associados à distribuição geográfica dos isolados, o Europeu, o Norte-americano, o Chinês e o Japonês.

A identidade do cluster Japonês foi recentemente esclarecida por Dong *et al.*, 2014. Os autores demonstraram que as duas estirpes japonesas AB008196 e AB008197, os isolados V26 e V70, não são estirpes oriundas do Japão mas sim oriundas dos EUA. A atribuição de uma origem Japonesa a estas estirpes foi um lapso derivado da contaminação com estirpes norte americanas. Esta contaminação poderá ter ocorrido devido ao extenso comércio global de equinos entre o Japão e os EUA, ou a contaminações de estirpes em ambiente laboratorial. Assim, até à data, só se encontra descrita uma estirpe de VAIE oriunda do Japão, sendo esta a Miyazaki, JX003263 (Dong *et al.*, 2013; Dong *et al.*, 2014; Gaudaire *et al.*, 2017).

7. CONCLUSÃO

Neste estudo concluímos que o Adefovir dipivoxil poderá ser utilizado como terapia antirretroviral para combater infeções de VAIE. Os estudos *in vitro* indicam um índice terapêutico muito satisfatório com inibições a concentrações nanomolares e grande tolerância das células equinas à citotoxicidade.

No entanto, são necessários estudos de segurança e eficácia em cavalos para prosseguir a avaliação do ADD como antiviral para o VAIE. Também são aconselhados estudos de IC₅₀ do ADD para diferentes isolados primários de VAIE provenientes dos 4 clusters encontrados na análise filogenética.

A análise da variabilidade genética da TR submetida à pressão do Adefovir dipivoxil parece indicar que não existem alterações significativas da enzima TR do VAIE. As variações encontradas para a TR do VAIE NT não foram muito diferentes das encontradas na TR do VAIE não submetido à pressão do ADD. Estes resultados parecem indicar que o VAIE não é muito propenso a resistências na presença do ADD.

De modo a avaliar melhor o efeito da ADD nas resistências do VAIE é aconselhável elaborar uma análise extensiva e mais pormenorizada das alterações da TR bem como do potencial impacto destas variações na estrutura e função enzimática da TR.

BIBLIOGRAFIA

- AGOPIAN, A., GROS, E., ALDRIAN-HERRADA, G., BOSQUET, N., CLAYETTE, P., e DIVITA, G. (2009). **A new generation of peptide-based inhibitors targeting HIV-1 reverse transcriptase conformational flexibility.** The Journal of biological chemistry (Baltimore, MD), Vol. 284(1), p. 254–64.
- ANGUS, P., VAUGHAN, R., XIONG, S., YANG, H., DELANEY, W., GIBBS, C., e LOCARNINI, S. (2003). **Resistance to adefovir dipivoxil therapy associated with the selection of a novel mutation in the HBV polymerase.** Gastroenterology. Vol. 125(2), p. 292–7.
- ASAHCHOP, E. L., WAINBERG, M. A., SLOAN, R. D., e TREMBLAY, C. L. (2012). **Antiviral drug resistance and the need for development of new HIV-1 reverse transcriptase inhibitors.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy (Washington, DC). Vol. 56(10), p. 5000–5008.
- BAYNES, J. W., & DOMINICZAK, M. H. (2015). **Bioquímica Médica.** (J. W. Baylor, Ed.) (4.^a ed.). Rio de Janeiro: Elsevier, p. 5-8.
- BEAN, P. (2005). **New drug targets for HIV.** Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. Vol. 41 Suppl 1, S96–S100.
- BORROTO-ESODA, K., e BOONE, L. R. (1991). **Equine infectious anemia virus and human immunodeficiency virus DNA synthesis in vitro: characterization of the endogenous reverse transcriptase reaction.** Journal of Virology (Washington, DC). Vol. 65(4), 1952–1959.
- BOYER, P. L., CLARK, P. K., e HUGHES, S. H. (2012). **HIV-1 and HIV-2 reverse transcriptases: different mechanisms of resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors.** Journal of Virology (Washington, DC). Vol. 86(10), p. 5885–5894.
- BUNCHORNTAVAKUL, C., e REDDY, K. R. (2015). **Review article: The efficacy and safety of daclatasvir in the treatment of chronic hepatitis C virus infection.** Alimentary Pharmacology and Therapeutics (Oxford). Vol. 42(3), p. 258–272.
- CAPOMACCIO, S., CAPPELLI, K., COOK, R. F., NARDI, F., GIFFORD, R., MARENZONI, M. L., e PASSAMONTI, F. (2012). **Geographic structuring of global EIAV isolates: a single origin for New World strains?** Virus research. Vol. 163(2), p. 656–9.
- CAPPELLI, K., CAPOMACCIO, S., COOK, R. F., FELICETTI, M., MARENZONI, M. L., COPPOLA, G., e PASSAMONTI, F. (2011). **Molecular detection, epidemiology, and genetic characterization of novel European field isolates of equine infectious anemia virus.** Journal of clinical microbiology (Washington, DC). Vol. 49(1), p. 27–33.
- CAPPELLI, K., COOK, R. F., STEFANETTI, V., PASSAMONTI, F., AUTORINO, G. L., SCICLUNA, M. T., e CAPOMACCIO, S. (2017). **Deep sequencing and variant analysis of an Italian pathogenic field strain of equine infectious anaemia virus.** Transboundary and Emerging Diseases. (December 2016), p. 1–9.

- CARVALHO, F. I., CRAIGO, J. K., BARNES, S., COSTA-RAMOS, C., e MONTELARO, R. C. (2008). **Characterization of an equine macrophage cell line: application to studies of EIAV infection.** Veterinary Microbiology. Vol. 136: p. 8–19.
- CHARMAN, H. P., BLADEN, S., GILDEN, R. V., e COGGINS, L. (1976). **Equine infectious anemia virus: evidence favoring classification as a retrovirus.** Journal of Virology (Washington, DC). Vol. 19, p. 1073–1079.
- CHEEVERS, W. P., e MCGUIRE, T. C. (1985). **Equine infectious anemia virus: immunopathogenesis and persistence.** Reviews of Infectious Diseases. Vol. 7, p. 83–88.
- CLEMENTS, J. E., & CHRISTINE ZINK, M. (1996). **Molecular biology and pathogenesis of animal lentivirus infections.** Clinical Microbiology Reviews. Vol.9(1), p. 100-117.
- COFFIN, J. M., HUGHES, S. H., e VARMUS, H. E. (1997). **Retroviruses.** Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN-10: 0-87969-571-4.
- COOK, R. F., LEROUX, C., COOK, S. J., BERGER, S. L., LICHTENSTEIN, D. L., GHABRIAL, N. N., e ISSEL, C. J. (1998). **Development and Characterization of an In Vivo Pathogenic Molecular Clone of Equine Infectious Anemia Virus.** Journal of Virology (Washington, DC). Vol. 72(2), p. 1383–1393.
- COOK, R. F., COOK, S. J., LI, F. L., MONTELARO, R. C., e ISSEL, C. J. (2002). **Development of a multiplex real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction for equine infectious anemia virus (EIAV).** Journal of Virological Methods (Amsterdam). Vol.105(1), p.171–179.
- COOK, R. F., LEROUX, C., e ISSEL, C. J. (2013). **Equine infectious anemia and equine infectious anemia virus in 2013: a review.** Veterinary Microbiology. Vol. 167(1–2), p. 181–204.
- CRAIGO, J. K., BARNES, S., ZHANG, B., COOK, S. J., HOWE, L., ISSEL, C. J., e MONTELARO, R. C. (2009). **An EIAV field isolate reveals much higher levels of subtype variability than currently reported for the equine lentivirus family.** Retrovirology. Vol. 6(1), p. 95.
- CRAIGO, J. K., EZZELARAB, C., COOK, S. J., LIU, C., HOROHOV, D., ISSEL, C. J., e MONTELARO, R. C. (2015). **Protective efficacy of centralized and polyvalent envelope immunogens in an attenuated equine lentivirus vaccine.** PLoS pathogens. Vol. 11(1), p. e1004610.
- CRUZ, F., FORES, P., IRELAND, J., MORENO, M. A., e NEWTON, R. (2015). **Freedom from equine infectious anaemia virus infection in Spanish Purebred horses.** Veterinary record. Vol. 2(1), p. e000074.
- CULLINANE, A., QUINLIVAN, M., NELLY, M., PATTERSON, H., KENNA, R., GARVEY, M., e JANKOWSKA, K. (2007). **Diagnosis of equine infectious anaemia during the 2006 outbreak in Ireland.** Veterinary Record. Vol. 161(19), p. 647–652.
- DAS, K., e ARNOLD, E. (2013a). **HIV-1 reverse transcriptase and antiviral drug**

- resistance. Part 1.** Current Opinion in Virology. Vol. 3(2), p. 111–118.
- DAS, K., e ARNOLD, E. (2013b). **HIV-1 reverse transcriptase and antiviral drug resistance. Part 2.** Current Opinion in Virology. Vol. 3(2), p. 119–128.
- DAS, K., MARTINEZ, S. E., BAUMAN, J. D., e ARNOLD, E. (2012). **HIV-1 reverse transcriptase complex with DNA and nevirapine reveals non-nucleoside inhibition mechanism.** Nature structural e molecular biology. Vol. 19(2), p.253–9.
- DE CLERCQ, E. (2004). **Antiviral drugs in current clinical use.** Journal of Clinical Virology. Vol. 30(2), p. 115–133.
- DE CLERCQ, E. (2008). **The discovery of antiviral agents: Ten different compounds, ten different stories.** Medicinal Research Reviews (New York, NY). Vol. 28(6), p. 929-953.
- DE CLERCQ, E. (2010). **In search of a selective therapy of viral infections.** Antiviral Research (Amsterdam). Vol. 85(1), p. 19-24.
- DEEKS, E. D. (2014). **Darunavir: A review of its use in the management of HIV-1 infection.** Drugs (New York, NY). Vol. 74(1), p. 99-125.
- DO NASCIMENTO, T. G., BASÍLIO JÚNIOR, I. D., MACEDO, R. O., MOURA, E. A., DORNELAS, C. B., BERNARDO, V. B., e Nóvak, C. (2010). **Characterization of the indinavir raw materials stability in some pharmaceutical processes.** Journal of Thermal Analysis and Calorimetry. Vol. 102(1), p. 269–275.
- DOMINGO, E., SHELDON, J., e PERALES, C. (2012). **Viral quasispecies evolution.** Microbiology and molecular biology reviews : MMBR. Vol. 76(2), p. 159–216.
- DONG, J. B., ZHU, W., COOK, F. R., GOTO, Y., HORII, Y., e HAGA, T. (2012). **Development of a nested PCR assay to detect equine infectious anemia proviral DNA from peripheral blood of naturally infected horses.** Archives of Virology (Vienna). Vol. 157(11), p. 2105–2111.
- DONG, J. B., ZHU, W., COOK, F. R., GOTO, Y., HORII, Y., e HAGA, T. (2013). **Identification of a novel equine infectious anemia virus field strain isolated from feral horses in southern Japan.** The Journal of general virology (London). Vol. 94(Pt 2), p. 360–5.
- DONG, J., COOK, F. R., e ZHU, W. (2014). **Equine infectious anemia virus in Japan: Viral isolates V70 and V26 are of North American not Japanese origin.** Veterinary Microbiology. Vol 174(1-2), p. 276-278.
- ELENA, S. F., e SANJUÁN, R. (2007). **Virus Evolution: Insights from an Experimental Approach.** Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics. Vol. 38(1), p. 27–52.
- ENOMOTO, L., ANDERSON, P. L., LI, S., EDELSTEIN, C. L., e WEINBERG, A. (2011). **Effect of nucleoside and nucleotide analog reverse transcriptase inhibitors on cell-mediated immune functions.** AIDS research and human retroviruses. Vol. 27(1), p. 47–55.
- FAMIGLINI, V., e SILVESTRI, R. (2016). **Focus on chirality of HIV-1 non-nucleoside**

- reverse transcriptase inhibitors.** *Molecules.* Vol. 21(2), p. 1–18.
- FELSENSTEIN, J. (1981). **Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach.** *Journal of Molecular Evolution.* Vol. 17(6), p. 368–376.
- GARRÉ, B., VAN DER MEULEN, K., NUGENT, J., NEYTS, J., CROUBELS, S., DE BACKER, P., e NAUWYNCK, H. (2007). **In vitro susceptibility of six isolates of equine herpesvirus 1 to acyclovir, ganciclovir, cidofovir, adefovir, PMEDAP and foscarnet.** *Veterinary Microbiology.* Vol. 122(1–2), p. 43–51.
- GAUDAIRE, D., LECOUTURIER, F., PONÇON, N., MORILLAND, E., LAUGIER, C., ZIENTARA, S., e HANS, A. (2017). **Molecular characterization of equine infectious anaemia virus from a major outbreak in southeastern France.** *Transboundary and Emerging Diseases,* p.1-7.
- GOFF, S. P. (1990). **Retroviral reverse transcriptase: synthesis, structure, and function.** *Journal of acquired immune deficiency syndromes.* Vol. 3(8), p. 817–31.
- HADZIYANNIS, S. J., TASSOPOULOS, N. C., HEATHCOTE, E. J., TINGTSUNG, C., KITIS, G., RIZZETTO, M., e BROSGART, C. L. (2003). **Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B.** *Journal of Medicine (New England).* Vol. 348(9), p. 800–807.
- HARROLD, S. M., COOK, S. J., COOK, R. F., RUSHLOW, K. E., ISSEL, C. J., e MONTELARO, R. C. (2000). **Tissue sites of persistent infection and active replication of equine infectious anemia virus during acute disease and asymptomatic infection in experimentally infected equids.** *Journal of Virology (Washington, DC).* Vol. 74(7), p. 3112–3121.
- HAWKINS, J. A., ADAMS, W. V., COOK, L., WILSON, B. H., e ROTH, E. E. (1973). **Role of horse fly (*Tabanus fuscicostatus hine*) and stable fly (*Stomoxys calcitrans* L.) in transmission in equine infectious anemia to ponies in Louisiana.** *American Journal of Veterinary Research.* Vol. 34(12), p. 1583–1586.
- HOL, A., e ROSENBERG, I. (1989). **9-(Phosponylmethoxyalkyl) Adenines, the method of preparation and utilization thereof.** United States Patente. Patente Number : 4,808,716.Czechoslovakia.
- HOWE, L., LEROUX, C., ISSEL, C. J., e MONTELARO, R. C. (2002). **Equine infectious anemia virus envelope evolution in vivo during persistent infection progressively increases resistance to in vitro serum antibody neutralization as a dominant phenotype.** *Journal of virology (Washington, DC).* Vol. 76(21), p. 10588–97.
- ISSEL, C. J., e COOK, R. F. (1993). **A Review of Techniques for the Serologic Diagnosis of Equine Infectious Anemia.** *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* Vol. 5(1), p. 137–141.
- ISSEL, C. J., COOK, S. J., COOK, R. F., e CORDES, T. R. (1999). **Optimal paradigms to detect reservoirs of equine infectious anemia virus (EIAV).** *Journal of Equine Veterinary Science.* Vol. 19, p. 728–732.
- ISSEL, C. J., COOK, R. F., MEALEY, R. H., e HOROHOF, D. W. (2014). **Equine infectious anemia in 2014: live with it or eradicate it?** *The Veterinary clinics of*

- North America. *Equine practice*. Vol. 30(3), p. 561–77.
- JIN, Z., JIN, L., PETERSON, D. L., e LAWSON, C. L. (1999). **Model for lentivirus capsid core assembly based on crystal dimers of EIAV p26**. *Journal of Molecular Biology*. Vol. 286(1), p. 83–93.
- JUKES, T. H., e CANTOR, C. R. (1969). **Mammalian Protein Metabolism, Evolution of Protein Molecules. CHAPTER 24 – Evolution of Protein Molecules**. New York: Academic Press. New York. Vol. III, p. 21-132.
- KAHN, J., LAGAKOS, S., WULFSOHN, M., CHERNG, D., MILLER, M., CHERRINGTON, J., e COAKLEY, D. (1999). **Efficacy and safety of adefovir dipivoxil with antiretroviral therapy: a randomized controlled trial**. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. Vol. 282(24), p. 2305–2312.
- KAYALI, Z., e SCHMIDT, W. N. (2014). **Finally sofosbuvir: An oral anti-HCV drug with wide performance capability**. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*. Vol. 7, p. 387–397.
- KOHLSTAEDT, L. A., WANG, J., FRIEDMAN, J. M., RICE, P. A., e STEITZ, T. A. (1992). **Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor**. *Science (New York, N.Y.)*. Vol. 256(5065), p. 1783–90.
- LEROUX, C., CRAIGO, J. K., ISSEL, C. J., e MONTELARO, R. C. (2001). **Equine infectious anemia virus genomic evolution in progressor and nonprogressor ponies**. *Journal of Virology (Washington, DC)*. Vol. 75(10), p. 4570–83.
- LEROUX, C., CADORÉ, J. L., e MONTELARO, R. C. (2004). **Equine Infectious Anemia Virus (EIAV): What has HIV's country cousin got tell us?** *Veterinary Research*. Vol. 35(4), p. 485–512.
- LIGNÉE, M. (1843). **Mémoire et observations sur une maladie de sang, connue sous le nom d'anémie hydrohémie, cachexie acquise du cheval**. *Recueil De Medecine Veterinaire Ec Alfort*. Vol. 20, p. 30–45.
- MALMQUIST, W. A., e BARNETT D., B. C. S. (1973). **Production of Equine Infectious Anemia Antiflen in a Persistently Infected Cell line**. *Archiv fiir die gesamte Virusforschung*. Vol. 42, p. 361–370.
- MARESCA, C., SCOCCIA, E., FACCENDA, L., ZEMA, J., e COSTARELLI, S. (2012). **Equine Infectious Anemia: Active Surveillance in Central Italy 2007-2009**. *Journal of Equine Veterinary Science*. Vol. 32(9), p. 596–598.
- MATHEKA, H. D., COGGINS, L., SHIVELY, J. N., e NORCROSS, N. L. (1976). **Purification and Characterization of Equine Infectious Anemia Virus**. *Journal of Virology (Washington, DC)*. Vol. 51(7), p. 107–114.
- MATSUDA, S., e KOYASU, S. (2000). **Mechanisms of action of cyclosporine**. *Immunopharmacology*. Vol. 47 (2-3), p. 119–125.
- MAURY, W., OAKS, J. L., e BRADLEY, S. (1998). **Equine endothelial cells support productive infection of equine infectious anemia virus**. *Journal of virology*. Vol. 72(11), p. 9291–7.

- MENÉNDEZ-ARIAS, L. (2009). **Mutation rates and intrinsic fidelity of retroviral reverse transcriptases.** *Viruses*. Vol. 1(3), p. 1137–1165.
- MENÉNDEZ-ARIAS, L. (2013). **Molecular basis of human immunodeficiency virus type 1 drug resistance: Overview and recent developments.** *Antiviral Research*. Vol. 98(1), p. 93–120.
- MICHAILIDIS, E., MARCHAND, B., KODAMA, E. N., SINGH, K., MATSUOKA, M., KIRBY, K. A, e Sarafianos, S. G. (2009). **Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by 4'-Ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine triphosphate, a translocation-defective reverse transcriptase inhibitor.** *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 284(51), p. 35681–91.
- MULATO, A. S., e CHERRINGTON, J. M. (1997). **Anti-HIV activity of adefovir (PMEA) and PMPA in combination with antiretroviral compounds: In vitro analyses.** *Antiviral Research*. Vol. 36(2), p. 91–97.
- NAESENS, L., SNOECK, R., ANDREI, G., BALZARINI, J., NEYTS, J., e DE CLERCQ, E. (1997). **HPMPC (cidofovir), PMEA (adefovir) and related acyclic nucleoside phosphonate analogues. A review of their pharmacology and clinical potential in the treatment of viral infections.** *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*. Vol. 8(1), p. 1–23.
- NOBLE, S., e GOA, K. L. (1999). **Adefovir dipivoxil.** *Drugs*. Vol. 58(3), p. 479–487.
- OAKS, J. L., MCGUIRE, T. C., ULIBARRI, C., e CRAWFORD, T. B. (1998). **Equine infectious anemia virus is found in tissue macrophages during subclinical infection.** *Journal of virology*. Vol. 72(9), p. 7263–9.
- OAKS, J. L., LONG, M. T., e BASZLER, T. V. (2004). **Leukoencephalitis associated with selective viral replication in the brain of a pony with experimental chronic equine infectious anemia virus infection.** *Veterinary Pathology*. Vol. 41(5), p. 527–532.
- OIE, (Organização Internacional das Epizootias). (2013). **Oie terrestrial manual 2013- Equine infectious anaemia chapter 2.5.6.** NB: Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2013, Chapter 2.
- OLMSTED, R. A., LANGLEY, R., ROELKE, M. E., GOEKEN, R. M., ADGER-JOHNSON, D., GOFF, J. P., e CARO, T. M. (1992). **Worldwide prevalence of lentivirus infection in wild feline species: epidemiologic and phylogenetic aspects.** *Journal of virology* (Washington, DC). Vol. 66(10), p. 6008–18.
- PAYNE, S. L., RAUSCH, J., RUSHLOW, K., MONTELARO, R. C., ISSEL, C., FLAHERTY, M., e FULLER, F. (1994). **Characterization of infectious molecular clones of equine infectious anaemia virus.** *Journal of General Virology*. Vol. 75(2), p. 425–429.
- POZZO, F. D., THIRY, E., DISEASES, A. V., DISEASES, P., e DISEASES, P. (2014). **Antiviral chemotherapy in veterinary medicine: current applications and perspectives.** *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties* (Paris). Vol. 33(302), p. 1–27.

- QAQISH, R. B., MATTES, K. A., e RITCHIE, D. J. (2003). **Adefovir dipivoxil: A new antiviral agent for the treatment of hepatitis B virus infection.** *Clinical Therapeutics*. Vol. 25(12), p. 3084–3099.
- QUINLIVAN, M., COOK, F., KENNA, R., CALLINAN, J. J., e CULLINANE, A. (2013). **Genetic characterization by composite sequence analysis of a new pathogenic field strain of equine infectious anemia virus from the 2006 outbreak in Ireland.** *Journal of General Virology*. Vol. 94(PART3), p. 612–622.
- RAMSAY, I. D., LESTNER, J. M., e BARKER, C. I. S. (2014). **Antiviral drugs.** *Side Effects of Drugs Annual*. Vol. 35, p. 503–550.
- RIZZARDI, G. P., HARARI, A., CAPILUPPI, B., TAMBUSSI, G., ELLEFSEN, K., CIUFFREDA, D. e PANTALEO, G. (2002). **Treatment of primary HIV-1 infection with cyclosporin A coupled with highly active antiretroviral therapy.** *Journal of Clinical Investigation (New York, NY)*. Vol. 109(5), p. 681–688.
- ROBERTS, J. D., BEBENEK, K., e KUNKEL, T. A. (1988). **The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1.** *Science (New York, N.Y.)*. Vol. 242(4882), p.1171–3.
- RYAN, S., TILEY, L., MCCONNELL, I., e BLACKLAWS, B. (2000). **Infection of dendritic cells by the Maedi-Visna lentivirus.** *Journal of Virology (Washington, DC)*. Vol. 74(21), p.10096–10103.
- SCICLUNA, M. T., ISSEL, C. J., COOK, F. R., MANNA, G., CERSINI, A., ROSONE, F., e AUTORINO, G. L. (2013). **Is a diagnostic system based exclusively on agar gel immunodiffusion adequate for controlling the spread of equine infectious anaemia?** *Veterinary Microbiology*. Vol. 165(1–2), p.123–134.
- SCIENCES, G. (2011). **Adefovir Dipivoxil Tablets Antiviral Agent.** Gilead Sciences Canada, Inc. p1-31.
- SOUQUET, M., RESTLE, T., KREBS, R., LE GRICE, S. F., GOODY, R. S., e WÖHRL, B. M. (1998). **Analysis of the polymerization kinetics of homodimeric EIAV p51/51 reverse transcriptase implies the formation of a polymerase active site identical to heterodimeric EIAV p66/51 reverse transcriptase.** *Biochemistry (Washington, DC)*. Vol. 37(35), p. 12144–52.
- SPIRA, S., WAINBERG, M. A., LOEMBA, H., TURNER, D., e BRENNER, B. G. (2003). **Impact of clade diversity on HIV-1 virulence, antiretroviral drug sensitivity and drug resistance.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy (London)*. Vol. 51(2), p. 229–240.
- TANG, Y. BO, PENG, Z. GEN, LIU, Z. YING, LI, Y. PING, JIANG, J. DONG, e LI, Z. RONG. (2007). **Some new acyclic nucleotide analogues as antiviral prodrugs: Synthesis and bioactivities in vitro.** *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters (Oxford)*. Vol. 17(22), p. 6350–6353.
- VALLÉE, H., e CARRÉ, H. (1904). **Sur la nature infectieuse de l'anémie du cheval.** *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences. D: Sciences Naturelles*. Vol. 139, p. 331–333.
- WANG, X.-F., LIN, Y.-Z., LI, Q., LIU, Q., ZHAO, W.-W., DU, C., e ZHOU, J.-H. (2016). **Genetic Evolution during the development of an attenuated EIAV**

vaccine. Retrovirology. Vol. 13(1), p. 9.

WEILAND, F., MATHEKA, H. D., COGGINS, L., e HARTNER, D. (1977). **Electron Microscopic Studies on Equine Infectious Anemia Virus (EIAV).** Archives of Virology (Vienna). Vol. 55, p. 335–340.

WHETTER, L., ARCHAMBAULT, D., PERRY, S., GAZIT, A., COGGINS, L., YANIV, A., e TRONICK, S. (1990). **Equine infectious anemia virus derived from a molecular clone persistently infects horses.** Journal of Virology (Washington, DC). Vol. 64(12), p. 5750–5756.

WIESINGER, D., e BOREL, J. F. (1980). **Studies on the Mechanism of Action of Cyclosporin A.** Immunobiology (Stuttgart). Vol. 156(4–5), p. 454–463.

YANG, Z. (1994). **Maximum likelihood phylogenetic estimation from DNA sequences with variable rates over sites: Approximate methods.** Journal of Molecular Evolution (New York, NY). Vol. 39(3), p. 306–314.

YOKOTA, T., KONNO, K., SHIGETA, S., HOLY, A., BALZARINI, J., e DE CLERCQ, E. (1994). **Inhibitory effects of acyclic nucleoside phosphonate analogues on hepatitis B virus DNA synthesis in HB611 cells.** Antiviral Chemistry and Chemotherapy. Vol. 5(2), p. 57–62.

MANUAL DE SOFTWARE:

QIAGEN, A. (2017). **Manual de Software CLC Genomics Workbench.** Versão 10.1.1., QIAGEN Aarhus- Silkeborgvej 2 Prismet, DK-8000 Aarhus C, Denmark.

ENDEREÇO ELETRÔNICO:

OIE. (2017). **Equine infectious anaemia, Spain.** [Em Linha]. [Consult. 18 Jul. 2017]. Disponível em WWW:<URL:<http://www.oie.int>>.

PUBCHEM. (2017). **Adefovir.** [Em Linha]. [Consult. 15 Agost. 2017] Disponível em WWW:<URL:<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>>.

PUBCHEM. (2017). **Daclatasvir.** [Em Linha]. [Consult. 15 Agost. 2017]. Disponível em WWW:<URL:<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>>.

SELLECKCHEM. (2017). **Adefovir dipivoxil.** [Em Linha]. [Consult. 15 Agost. 2017]. Disponível em WWW:<URL:<http://www.selleckchem.com>>.

SELLECKCHEM. (2017). **Cyclosporina A.** [Em Linha]. [Consult. 15 Agost. 2017]. Disponível em WWW:URL:<http://www.selleckchem.com>.

SELLECKCHEM. (2017). **Zidovudine.** [Em Linha]. [Consult. 15 Agost. 2017]. Disponível em WWW:<URL:<http://www.selleckchem.com>>.

NCBI. (2016). **Reference Sequence: NP_001450.** [Em Linha]. [Consult. 17 Agost. 2017]. Disponível em WWW:<URL:<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>>.

NCBI. (2016). **Pol protein [Equine infectious anemia virus].** [Em Linha]. [Consult. 01 Set. 2017]. Disponível em WWW:<URL:<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>>.

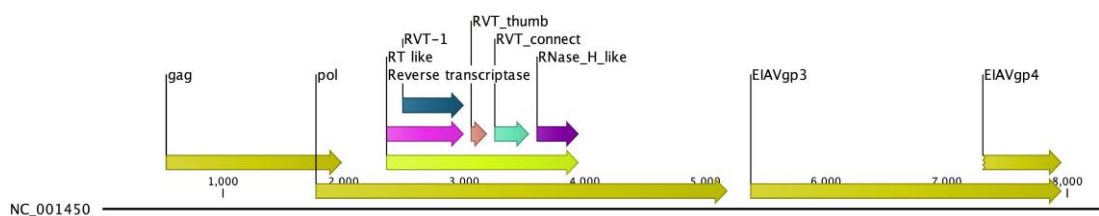
NCBI. (2016). **pol polyprotein [Equine infectious anemia virus]**. [Em Linha].
[Consult. 17 Agost. 2017]. Disponível em
WWW:<[URL:https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)>.

NCBI-GENBANK. (2016). **EIAV**. [Em Linha]. [Consult. 04 Set. 2017]. Disponível em
WWW:<[URL:https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)>.

ANEXOS

ANEXO I

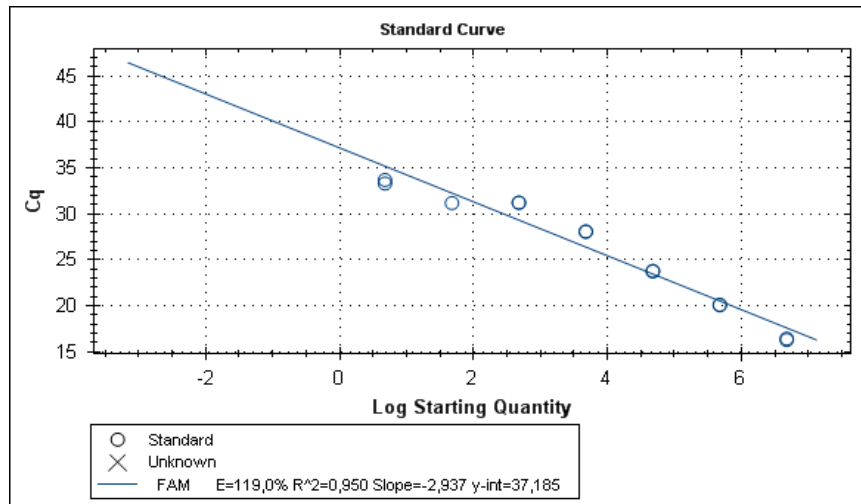
A **Erro! A origem da referência não foi encontrada.** sequência de referência do VAIE_{WYO} (NC_001450) onde o gene gag se encontra da posição 525-1985bp, o gene pol da posição 1766 à 5182bp, gene EIAVgp3 (poliproteínas do envelope) da posição 5372 a 7951bp e EIAVgp4 (ORF; NH2-terminus) da posição 7295 à 7951bp. O gene pol onde se encontra localizada a TR na posição 196 à 728, esta enzima é composta por vários domínios que foram anotados à sequência de acordo com a localização na Pol, RT_Like na posição 196 à 411bp, RVT-1 na posição 241 à 41bp, RVT_thumb na posição 430 à 473bp, RVT_connect na posição 495 à 589 e RNase_H_like na posição 613 à 728bp (NCBI- pol polyprotein [Equine infectious anemia virus], acedido a 1 setembro 2017).



Sequência de referência NC_001450 anotada com as regiões do vírus AIE, e domínios RVT_Like, RVT-1, RVT_thumb, RVT_connect e a RNase_H_like. (NCBI Reference Sequence: NP_001450, acedido a 17 agosto 2017)

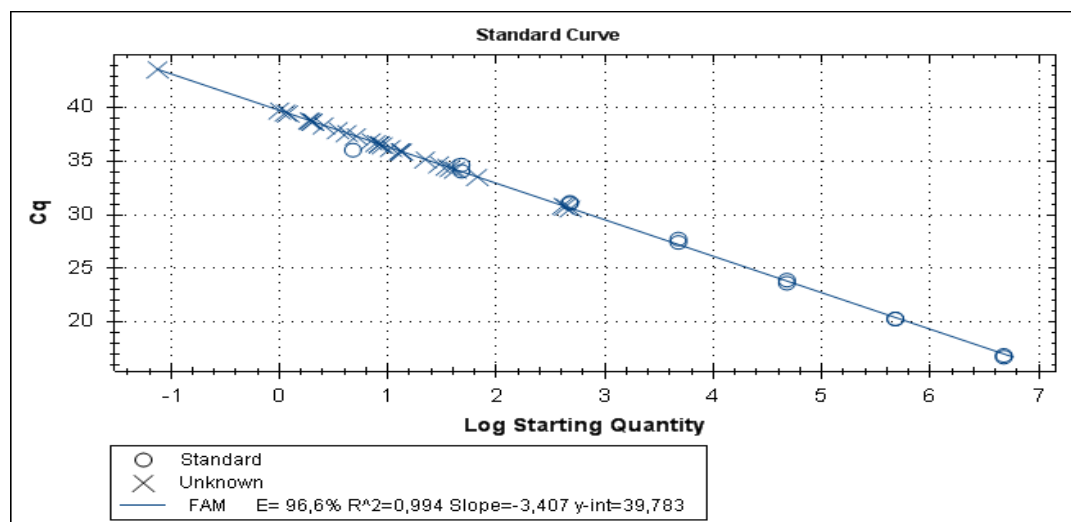
ANEXO II

Curva padrão do ensaio com vários antivirais



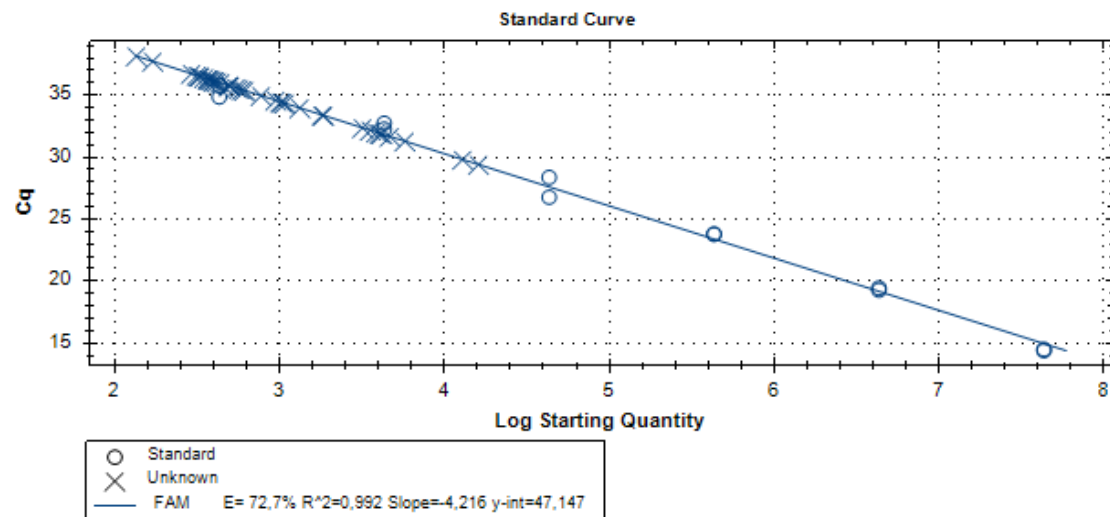
ANEXO III

Curva padrão ensaio IC₅₀ Adefovir dipivoxil na replicação viral em células ED com VAIE_{wyo} com 7 dias de incubação.



ANEXO IV

Curva padrão ensaio IC50 Adefovir dipivoxil na replicação viral em células DE com VAIE_{WYO} com 12, 24 e 33 dias de incubação



ANEXO V

Sequências de WYO NT

NºSequência	Sequência	Fragmento	Tipo de Amostra	Tamanho do Fragmento	Nome da Amostra
1	1639BAB004-4	P	ARN	1704	WYO NT
2	1639BAB004-5	P	ARN	1753	WYO NT
3	1639BAB004-1	P	ARN	1739	WYO NT
4	1639BAB004-2	P	ARN	1792	WYO NT
5	1639BAB004-3	P	ARN	1924	WYO NT
6	17D3BAA007-24	EBB	ARN	614	WYO NT
7	17D3BAA007-17	EBB	ARN	267	WYO NT
8	17D3BAA007-18	EBB	ARN	262	WYO NT
9	17D3BAA007-11	EBB	ARN	443	WYO NT
10	17D3BAA007-12	EBB	ARN	441	WYO NT
11	17D3BAA007-23	EBB	ARN	625	WYO NT
12	17D3BAA016-07	A	ARN	1201	WYO NT
13	17D3BAA016-08	A	ARN	1185	WYO NT
14	17D3BAA016-09	A	ARN	1101	WYO NT
15	17D3BAA016-10	A	ARN	1086	WYO NT
16	17D3BAA016-11	A	ARN	1077	WYO NT
17	17D3BAA016-12	EBB	ARN	758	WYO NT
18	17D3BAA016-13	EBB	ARN	589	WYO NT
19	17D3BAA016-14	EBB	ARN	620	WYO NT
20	17D3BAA016-15	A	ARN	1007	WYO NT
21	17D3BAA016-16	A	ARN	974	WYO NT
22	17D3BAA016-17	A	Sobrenadante	727	WYO NT d12
23	17D3BAA016-18	A	Sobrenadante	769	WYO NT d12
24	17D3BAA017-23	EBB	Sobrenadante	484	WYO NT d24
25	17D3BAA017-24	EBB	Sobrenadante	497	WYO NT d24
26	17D3BAA017-25	EBB	Sobrenadante	496	WYO NT d24
27	17D3BAA017-26	EBB	Sobrenadante	482	WYO NT d24
28	17D3BAA017-39	EBB	Sobrenadante	990	WYO NT d33
29	17D3BAA017-40	EBB	Sobrenadante	872	WYO NT d33
30	17D3BAA017-41	EBB	Sobrenadante	1038	WYO NT d33
31	17D3BAA017-42	EBB	Sobrenadante	494	WYO NT d33
32	17D3BAA017-43	EBB	Sobrenadante	674	WYO NT d12
33	17D3BAA017-44	EBB	Sobrenadante	493	WYO NT d12
34	17D3BAA017-45	EBB	Sobrenadante	505	WYO NT d12
35	17D3BAA017-46	EBB	Sobrenadante	495	WYO NT d12
36	17D3BAA017-47	A	ARN	1546	WYO NT d12
37	17D3BAA017-48	A	ARN	1477	WYO NT d12
38	17D3BAA017-49	A	ARN	1542	WYO NT d12
39	17D3BAA017-50	A	ARN	1493	WYO NT d12
40	17D3BAA017-51	K	ARN	1176	WYO NT d12
41	17D3BAA017-52	K	ARN	1310	WYO NT d12
42	17D3BAA017-53	K	ARN	1535	WYO NT d12
43	17D3BAA017-54	K	ARN	1552	WYO NT d12
44	17D3BAA017-55	K	ARN	1395	WYO NT d12
45	17D3BAA017-56	K	ARN	1541	WYO NT d12
46	17D3BAA017-57	K	ARN	1898	WYO NT d12
47	17D3BAA017-58	K	ARN	1317	WYO NT d12
48	17D3BAA017-59	P	ARN	1471	WYO NT d12
49	17D3BAA017-60	P	ARN	1485	WYO NT d12
50	17D3BAA017-61	P	ARN	1335	WYO NT d12
51	17D3BAA017-62	P	ARN	1480	WYO NT d12
52	17D3BAA017-63	P	ARN	1446	WYO NT d12
53	17D3BAA017-64	P	ARN	1480	WYO NT d12
54	17D3BAA017-65	P	ARN	1411	WYO NT d12
55	17D3BAA017-66	P	ARN	1289	WYO NT d12
56	17D3BAA017-67	K	ARN	1393	WYO NT d12
57	17D3BAA017-68	K	ARN	1274	WYO NT d12
58	17D3BAA017-69	K	ARN	1398	WYO NT d12
59	17D3BAA017-70	K	ARN	1405	WYO NT d12
60	17D3BAA018-01	K	ARN	1555	WYO NT d12
61	17D3BAA018-02	K	ARN	1581	WYO NT d12
62	17D3BAA018-03	K	ARN	1629	WYO NT d12
63	17D3BAA018-04	K	ARN	1651	WYO NT d12
64	17D3BAA018-05	A	ARN	1097	WYO NT d12

NºSequência	Sequência	Fragmento	Tipo de Amostra	Tamanho do Fragmento	Nome da Amostra
65	17D3BAA018-06	A	ARN	1377	WYO NT d12
66	17D3BAA018-07	K	ARN	1603	WYO NT d12
67	17D3BAA018-08	K	ARN	1577	WYO NT d12
68	17D3BAA018-15	EBB	Sobrenadante	493	WYO NT d24
69	17D3BAA018-16	EBB	Sobrenadante	479	WYO NT d24
70	17D3BAA018-23	EBB	Sobrenadante	482	WYO NT d33
71	17D3BAA018-24	EBB	Sobrenadante	498	WYO NT d33
72	17D3BAA018-25	EBB	Sobrenadante	492	WYO NT d12
73	17D3BAA018-26	EBB	Sobrenadante	499	WYO NT d12
74	17D3BAA018-27	EBB	Sobrenadante	493	WYO NT d33
75	17D3BAA018-28	EBB	Sobrenadante	480	WYO NT d33
76	17D3BAA018-29	EBB	Sobrenadante	489	WYO NT d34
77	17D3BAA018-30	EBB	Sobrenadante	486	WYO NT d35
78	17D3BAA018-35	K	ARN	1534	WYO NT d12
79	17D3BAA018-36	K	ARN	1520	WYO NT d12
80	17D3BAA018-37	L	ARN	1564	WYO NT d12
81	17D3BAA018-38	L	ARN	1565	WYO NT d12
82	17D3BAA018-39	A	Sobrenadante	1199	WYO NT d33
83	17D3BAA018-40	A	Sobrenadante	1308	WYO NT d33
84	17D3BAA018-41	A	Sobrenadante	1084	WYO NT d33
85	17D3BAA018-42	A	Sobrenadante	1371	WYO NT d33
86	17D3BAA018-43	A	Sobrenadante	1299	WYO NT d33
87	17D3BAA018-44	A	Sobrenadante	1320	WYO NT d33
88	17D3BAA018-45	A	Sobrenadante	1522	WYO NT d33
89	17D3BAA018-46	A	Sobrenadante	1316	WYO NT d33
90	17D3BAA018-47	A	Sobrenadante	1425	WYO NT d33
91	17D3BAA018-48	A	Sobrenadante	1301	WYO NT d33
92	17D3BAA018-49	A	Sobrenadante	1388	WYO NT d33
93	17D3BAA018-50	A	Sobrenadante	1312	WYO NT d33
94	17D3BAA018-63	P	ARN	1373	WYO NT d12
95	17D3BAA018-64	P	ARN	905	WYO NT d12
96	17D3BAA018-65	P	ARN	969	WYO NT d12
97	17D3BAA018-66	P	ARN	1349	WYO NT d12
98	17D3BAA018-67	P	ARN	1513	WYO NT d12
99	17D3BAA018-68	P	ARN	947	WYO NT d12
100	17D3BAA018-69	P	ARN	882	WYO NT d12
101	17D3BAA018-70	P	ARN	1387	WYO NT d12
102	17D3BAA019-01	K	Sobrenadante	1836	WYO NT
103	17D3BAA019-01	K	Sobrenadante	1836	WYO NT
104	17D3BAA019-02	K	Sobrenadante	1767	WYO NT
105	17D3BAA019-02	K	Sobrenadante	1767	WYO NT
106	17D3BAA019-03	K	Sobrenadante	1823	WYO NT
107	17D3BAA019-03	K	Sobrenadante	1823	WYO NT
108	17D3BAA019-04	K	Sobrenadante	1629	WYO NT
109	17D3BAA019-04	K	Sobrenadante	1629	WYO NT
110	17D3BAA019-05	K	Sobrenadante	1566	WYO NT
111	17D3BAA019-05	K	Sobrenadante	1566	WYO NT
112	17D3BAA019-06	K	Sobrenadante	1678	WYO NT
113	17D3BAA019-06	K	Sobrenadante	1678	WYO NT
114	17D3BAA019-07	K	Sobrenadante	1604	WYO NT
115	17D3BAA019-07	K	Sobrenadante	1604	WYO NT
116	17D3BAA019-08	K	Sobrenadante	1732	WYO NT
117	17D3BAA019-08	K	ARN	1732	WYO NT
118	17D3BAA019-17	K	ARN	1662	WYO NT
119	17D3BAA019-17	K	ARN	1662	WYO NT
120	17D3BAA019-18	K	ARN	1666	WYO NT
121	17D3BAA019-18	K	ARN	1666	WYO NT
122	17D3BAA019-19	K	ARN	1594	WYO NT
123	17D3BAA019-19	K	ARN	1594	WYO NT
124	17D3BAA019-20	K	ARN	1698	WYO NT
125	17D3BAA019-20	K	ARN	1698	WYO NT
126	17D3BAA019-21	K	ARN	1538	WYO NT
127	17D3BAA019-21	K	ARN	1538	WYO NT
128	17D3BAA019-22	K	ARN	1533	WYO NT
129	17D3BAA019-22	K	ARN	1533	WYO NT
130	17D3BAA019-23	K	ARN	1553	WYO NT
131	17D3BAA019-23	K	ARN	1553	WYO NT
132	17D3BAA019-24	K	ARN	1604	WYO NT
133	17D3BAA019-24	K	ARN	1604	WYO NT

ANEXO VI

Sequências de WYO ADD

NºSequências	Sequência	Fragmento	Tipo de Amostra	Tamanho do Fragmento	Nome da Amostra	NºSequências	Sequência	Fragmento	Tipo de Amostra	Tamanho do Fragmento	Nome da Amostra
1	17D3BAA017-11	EB	sobrenadante	517	WYO ADD 78nM d24	54	17D3BAA019-10	K	sobrenadante	1674	WYO ADD19.53nM d33
2	17D3BAA017-12	EB	sobrenadante	503	WYO ADD 78nM d24	55	17D3BAA019-11	K	sobrenadante	1634	WYO ADD19.53nM d33
3	17D3BAA017-13	EB	sobrenadante	507	WYO ADD 78nM d24	56	17D3BAA019-12	K	sobrenadante	1626	WYO ADD19.53nM d33
4	17D3BAA017-14	EB	sobrenadante	501	WYO ADD 78nM d24	57	17D3BAA019-13	K	sobrenadante	1699	WYO ADD19.53nM d33
5	17D3BAA017-15	EB	sobrenadante	478	WYO ADD 39nM d24	58	17D3BAA019-14	K	sobrenadante	1731	WYO ADD19.53nM d33
6	17D3BAA017-16	EB	sobrenadante	493	WYO ADD 39nM d24	59	17D3BAA019-15	K	sobrenadante	1673	WYO ADD19.53nM d33
7	17D3BAA017-17	EB	sobrenadante	504	WYO ADD 39nM d24	60	17D3BAA019-16	K	sobrenadante	1684	WYO ADD19.53nM d33
8	17D3BAA017-18	EB	sobrenadante	476	WYO ADD 39nM d24	61	17D3BAA019-25	K	sobrenadante	1609	WYO ADD19.53nM d33
9	17D3BAA017-19	EB	sobrenadante	498	WYO ADD 19.5nM d24	62	17D3BAA019-26	K	sobrenadante	1466	WYO ADD19.53nM d33
10	17D3BAA017-20	EB	sobrenadante	494	WYO ADD 19.5nM d24	63	17D3BAA019-27	K	sobrenadante	1499	WYO ADD19.53nM d33
11	17D3BAA017-21	EB	sobrenadante	497	WYO ADD 19.5nM d24	64	17D3BAA019-28	K	sobrenadante	1342	WYO ADD19.53nM d33
12	17D3BAA017-22	EB	sobrenadante	482	WYO ADD 19.5nM d33	65	17D3BAA019-29	K	sobrenadante	1531	WYO ADD19.53nM d33
13	17D3BAA017-23	EB	sobrenadante	496	WYO ADD 78nM d33	66	17D3BAA019-30	K	sobrenadante	1351	WYO ADD19.53nM d33
14	17D3BAA017-28	EB	sobrenadante	498	WYO ADD 78nM d33	67	17D3BAA019-31	K	sobrenadante	1501	WYO ADD19.53nM d33
15	17D3BAA017-29	EB	sobrenadante	505	WYO ADD 78nM d33	68	17D3BAA019-32	K	sobrenadante	1345	WYO ADD19.53nM d33
16	17D3BAA017-30	EB	sobrenadante	471	WYO ADD 78nM d33	69	17D3BAA019-33	K	sobrenadante	1567	WYO ADD19.53nM d33
17	17D3BAA017-31	EB	sobrenadante	497	WYO ADD 39nM d33	70	17D3BAA019-34	K	sobrenadante	1517	WYO ADD19.53nM d33
18	17D3BAA017-32	EB	sobrenadante	503	WYO ADD 39nM d33	71	17D3BAA019-35	K	sobrenadante	1539	WYO ADD19.53nM d33
19	17D3BAA017-33	EB	sobrenadante	698	WYO ADD 39nM d33	72	17D3BAA019-36	K	sobrenadante	1474	WYO ADD19.53nM d33
20	17D3BAA017-34	EB	sobrenadante	490	WYO ADD 39nM d33	73	17D3BAA019-37	K	sobrenadante	1394	WYO ADD19.53nM d33
21	17D3BAA017-35	EB	sobrenadante	497	WYO ADD 19.5nM d33	74	17D3BAA019-38	K	sobrenadante	1411	WYO ADD19.53nM d33
22	17D3BAA017-36	EB	sobrenadante	760	WYO ADD 19.5nM d33	75	17D3BAA019-39	K	sobrenadante	1437	WYO ADD19.53nM d33
23	17D3BAA017-37	EB	sobrenadante	502	WYO ADD 19.5nM d33	76	17D3BAA019-40	K	sobrenadante	1425	WYO ADD19.53nM d33
24	17D3BAA017-38	EB	sobrenadante	490	WYO ADD 19.5nM d33	77	17D3BAA019-41	A	RNA	1478	WYO ADD19.53nM d33
25	17D3BAA018-09	EB	sobrenadante	488	WYO ADD 78.13 nM d24	78	17D3BAA019-42	A	RNA	1405	WYO ADD19.53nM d33
26	17D3BAA018-10	EB	sobrenadante	487	WYO ADD 78.13 nM d24	79	17D3BAA019-43	A	RNA	1461	WYO ADD19.53nM d33
27	17D3BAA018-11	EB	sobrenadante	485	WYO ADD 39.06 nM d24	80	17D3BAA019-44	A	RNA	1416	WYO ADD19.53nM d33
28	17D3BAA018-12	EB	sobrenadante	481	WYO ADD 39.06 nM d24	81	17D3BAA019-45	A	RNA	1349	WYO ADD19.53nM d33
29	17D3BAA018-13	EB	sobrenadante	549	WYO ADD 19.53 nM d24	82	17D3BAA019-46	A	RNA	1346	WYO ADD19.53nM d33
30	17D3BAA018-14	EB	sobrenadante	551	WYO ADD 19.53 nM d24	83	17D3BAA019-47	A	RNA	1369	WYO ADD19.53nM d33
31	17D3BAA018-17	EB	sobrenadante	542	WYO ADD 78.13 nM d33	84	17D3BAA019-48	A	RNA	1381	WYO ADD19.53nM d33
32	17D3BAA018-18	EB	sobrenadante	501	WYO ADD 78.13 nM d33	85	17D3BAA019-49	A	RNA	1412	WYO ADD19.53nM d33
33	17D3BAA018-19	EB	sobrenadante	486	WYO ADD 39.06 nM d33	86	17D3BAA019-50	A	RNA	1378	WYO ADD19.53nM d33
34	17D3BAA018-20	EB	sobrenadante	482	WYO ADD 39.06 nM d33	87	17D3BAA019-51	A	RNA	1397	WYO ADD19.53nM d33
35	17D3BAA018-21	EB	sobrenadante	484	WYO ADD 19.53 nM d33	88	17D3BAA019-52	A	RNA	1365	WYO ADD19.53nM d33
36	17D3BAA018-22	EB	sobrenadante	545	WYO ADD 19.53 nM d33	89	17D3BAA019-53	A	RNA	1291	WYO ADD19.53nM d33
37	17D3BAA018-31	EB	sobrenadante	478	WYO ADD 19.53 nM d33	90	17D3BAA019-54	A	RNA	1330	WYO ADD19.53nM d33
38	17D3BAA018-32	EB	sobrenadante	478	WYO ADD 19.53 nM d33	91	17D3BAA019-55	K	RNA	1588	WYO ADD19.53nM d33
39	17D3BAA018-33	EB	sobrenadante	561	WYO ADD 19.53 nM d33	92	17D3BAA019-56	K	RNA	1115	WYO ADD19.53nM d33
40	17D3BAA018-34	EB	sobrenadante	495	WYO ADD 19.53 nM d33	93	17D3BAA019-57	K	RNA	1180	WYO ADD19.53nM d33
41	17D3BAA018-51	A	sobrenadante	1448	WYO ADD 19.53 nM d33	94	17D3BAA019-58	K	RNA	1349	WYO ADD19.53nM d33
42	17D3BAA018-52	A	sobrenadante	1393	WYO ADD 19.53 nM d33	95	17D3BAA019-59	K	RNA	1538	WYO ADD19.53nM d33
43	17D3BAA018-53	A	sobrenadante	1426	WYO ADD 19.53 nM d33	96	17D3BAA019-60	K	RNA	1353	WYO ADD19.53nM d33
44	17D3BAA018-54	A	sobrenadante	1412	WYO ADD 19.53 nM d33	97	17D3BAA019-61	K	RNA	1625	WYO ADD19.53nM d33
45	17D3BAA018-55	A	sobrenadante	1433	WYO ADD 19.53 nM d33	98	17D3BAA019-62	K	RNA	1379	WYO ADD19.53nM d33
46	17D3BAA018-56	A	sobrenadante	1392	WYO ADD 19.53 nM d33	99	17D3BAA019-63	K	RNA	1783	WYO ADD19.53nM d33
47	17D3BAA018-57	A	sobrenadante	1324	WYO ADD 19.53 nM d33	100	17D3BAA019-64	K	RNA	1537	WYO ADD19.53nM d33
48	17D3BAA018-58	A	sobrenadante	1323	WYO ADD 19.53 nM d33	101	17D3BAA019-65	K	RNA	1716	WYO ADD19.53nM d33
49	17D3BAA018-59	A	sobrenadante	1369	WYO ADD 19.53 nM d33	102	17D3BAA019-66	K	RNA	1367	WYO ADD19.53nM d33
50	17D3BAA018-60	A	sobrenadante	1327	WYO ADD 19.53 nM d33	103	17D3BAA019-67	K	RNA	1744	WYO ADD19.53nM d33
51	17D3BAA018-61	A	sobrenadante	1393	WYO ADD 19.53 nM d33	104	17D3BAA019-68	K	RNA	1356	WYO ADD19.53nM d33
52	17D3BAA018-62	A	sobrenadante	1338	WYO ADD 19.53 nM d33	105	17D3BAA019-69	K	RNA	1673	WYO ADD19.53nM d33
53	17D3BAA019-09	K	sobrenadante	1686	WYO ADD19.53nM d33	106	17D3BAA019-70	K	RNA	1513	WYO ADD19.53nM d33

ANEXO VII

Códigos IUPAC para nucleotídeos

Code	Description
A	Adenine
C	Cytosine
G	Guanine
T	Thymine
U	Uracil
R	Purine (A or G)
Y	Pyrimidine (C, T, or U)
M	C or A
K	T, U, or G
W	T, U, or A
S	C or G
B	C, T, U, or G (not A)
D	A, T, U, or G (not C)
H	A, T, U, or C (not G)
V	A, C, or G (not T, not U)
N	Any base (A, C, G, T, or U)

ANEXO IIIII

Tabela do Código Genético (Baseado nos Codons)

		Segunda Base				
		U	C	A	G	
Principia Base 5'	U	UUU } Fenil-alanina UUC } UUA } Leucina UUG }	UCU } UCC } Serina UCA } UCG }	UAU } Tirosina UAC } UAA } Stop codon UAG } Stop codon	UGU } Cysteine UGC } UGA } Stop codon UGG } Tryptophan	Terceira Base 3'
	C	CUU } CUC } Leucina CUA } CUG }	CCU } CCC } Prolina CCA } CCG }	CAU } Histidina CAC } CAA } Glutamina CAG }	CGU } CGC } Arginina CGA } CGG }	
	A	AUU } Isoleucina AUC } AUA } AUG } Metionina start codon	ACU } ACC } Treonina ACA } ACG }	AAU } Asparagina AAC } AAA } Lisina AAG }	AGU } Serina AGC } AGA } Arginina AGG }	
	G	GUU } GUC } Valina GUA } GUG }	GCU } GCC } Alanina GCA } GCG }	GAU } Ácido GAC } Aspártico GAA } Ácido GAG } Glutâmico	GGU } GGC } Glicina GGA } GGG }	

Alinhamento das sequências de VAIE, com distribuição geográfica diferente, com a sequência de referência NC 001450



